17 M N

Über die katalytische Oxydation einiger Steroidglucoside

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Klaus Winguth
aus Bütow in Pommern

Hamburg
1961

Über die katalytische Oxydation einiger Steroidglucoside

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Klaus Winguth
aus Bütow in Pommern

Hamburg
1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

auf Antrag von Herrn Professor Dr. R. Tschesche

Hamburg, den 8. Februar 1961

Professor Dr. E. Otremba
Dekan

Alle Rechte vorbehalten.

Als Manuskript vervielfältigt in der Fotostelle der Bibliothek des Instituts für Weltwirtschaft, Kiel

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1958 bis November 1960 in der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstitutes für Organische Chemie der Universität Hamburg ausgeführt.

Meinem sehr verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. R. Tschesche,

möchte ich auf diesem Wege für die vielen Anregungen, die er mir während der Arbeit zuteil werden ließ, recht herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Allgemeiner Verlauf von Synthese und Oxydation der Steroidglucoside	4
III.	Darstellung und chromatographisches Verhalten der Steroidglucoside	5
1.	Cholesterin-ß-D-glucosid	5
2.	Ergosterin-ß-D-glucosid	5
3.	Androstan-3α-ol-17-on-ß-D-glucosid	6
4.	Δ^5-Androsten-3ß-ol-17-on-ß-D-glucosid	7
IV.	Oxydation und Oxydationsprodukte der Steroidglucoside	9
1.	Oxydation von Cholesterin-ß-D-glucosid	9
2.	Oxydation von Ergosterin-ß-D-glucosid	1o
3.	Oxydation von Androstan-3α-ol-17-on-ß-D-glucosid	11
a	Die Oxydation des Glucosids	11
b	Aufarbeitungsmethoden	12
c	Analyse des Oxydationsproduktes	14
d	Chromatographiedes Oxydationsproduktes	15
e	Produkt S III	17
f	Androsteronglucuronsäure und ihre Salze	17
4.	Oxydation von Δ^5-Androsten-3ß-ol-17-on-ß-D-glucosid	2o
a	Oxydation und Aufarbeitung	2o
b	Dehydro-epi-androsteronsäure und ihr Natriumsalz	21
5.	Die Infrarot-Spektren	23
6.	Vergleich der Darstellungsmethoden von Steroidglucuronsäuren	28
V.	Zusammenfassung	3o
VI.	Experimenteller Teil	31
VII.	Literaturverzeichnis	62

I. Einleitung

Als Emil F i s c h e r[1] die Identität der von ihm mit Natriumamalgan reduzierten Zuckersäure mit dem sauren Hydrolysenprodukt der Campherglucuronsäure[2] feststellte, war die Konstitution der Glucuronsäure und gleichzeitig deren Synthese im Organismus bewiesen. Nach Verfütterung von Campher an Hunde wurde dieser vom Organismus in Form seines Glucuronsäurederivates entgiftet und im Urin ausgeschieden. Diese Entgiftung ist besonders durch die Urochloralsäure[3] bekannt geworden, die nach Chloralgabe im Harn auftritt, und deren Spaltungsprodukt ebenfalls die Glucuronsäure ist.

Es ist daher nicht sehr erstaunlich, daß es C o h e n und Mitarbeitern[4,5] gelang, aus dem Urin von Schwangeren Steroidglucuronide zu isolieren. Das Corpus Luteum Hormon, Progesteron, liefert, wahrscheinlich nach Reduktion zum Pregnandiol, Pregnandiolglucuronid. Ebenfalls wurden im Harn Glucuronsäuren der Androgene[6] gefunden, die auch in Gewebeschnitten auftraten, wenn diese mit Testosteron inkubiert wurden[7]. So führt die Injektion von Testosteron zum Glucuronid des Δ^4-Androstendions, dessen Glykosidbindung wahrscheinlich über eine Enolform erfolgt[8]. Die Ausscheidungsformen der Sexualhormone sind somit Steroidglucuronsäuren. Daneben werden Steroidsulfate und in geringen Mengen freie Sexualhormone ausgeschieden. Die Gegenwart der Glucuronate wurde -neben direkter Isolierung- nach Hydrolyse mit ß-Glucuronidase und anschließender Chromatographie durch Farbreaktionen festgestellt.

Als Vergleichssubstanz und zu Hydrolyseversuchen[9] wurden jetzt synthetische Steroidglucuronsäuren benötigt. Als erstem gelang es S h a p i r o[10], mit Hilfe der K ö n i g s - K n o r r - Reaktion[11] aus Acetobromglucuronsäuremethylester und Dehydroandrosteron, Testosteron, Oestradiol und Cholesterin die Methylester der entsprechenden Glucuronsäuren zu synthetisieren. Die Entacetylierung mit $Ba(OH)_2$ oder anderen Alkalien und Überführung in die freie Säure schien mit Schwierigkeiten verbunden zu sein, da nur die Glucuronsäure des Dehydroandrosterons und Oestradiols frei und charakterisierbar darzustellen waren. In dieser Arbeit und folgenden Veröffentlichungen verschiedener Autoren[12,13,14] wurden die aus dem Harn isolierten Glucuronide methyliert und acetyliert und mit den synthetischen, acetylierten Steroidglucuronsäuremethylestern verglichen. Es war also wünschenswert, in das ungeschützte Steroidglykosid die Carboxylgruppe einzuführen. Oxydationen mit N_2O_4[15], mit H_2O_2 und Spuren Fe^{III}[16] oder elektrolytische Oxydation[17] könnten zwar zu den entsprechenden Uronsäuren führen. Da aber die sekundären OH-Gruppen durch Acetylierung geschützt werden müssen und die Ausbeuten gering sind, erscheinen diese Verfahren ungeeignet. Es lag nun nahe, auf Methoden der selektiven katalytischen Oxydation zurückzugreifen, die in der Zusammenfassung von K. H e y n s und H. P a u l s e n [18] vielversprechend erwähnt werden. 1:2-Isopropyliden-D-Glucofuranose wird durch feinverteiltes Platin nach M e h l t r e t t e r[19] in 43 proz. Ausbeute in das Glucuronsäurelacton überführt. Menthylglucosid konnte nach M a r s h [20] in 31 proz. Ausbeute zu Menthylglucuronsäure oxydiert werden. Es gelang zunächst nicht, die Phenylglucuronsäure darzustellen. Wahrscheinlich hemmte freigewordenes Phenol den Katalysator. Unter etwas anderen Bedingungen

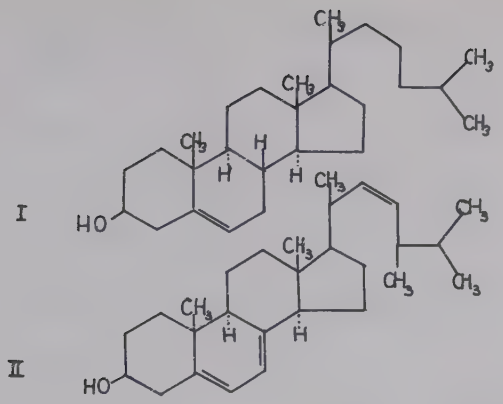
synthetisierten K w a n - C h u n g T s o u und S e l i g - m a n n[21] sowohl Phenylglucuronid als auch 2-Naphthyl-ß-glucuronid. Auf Grund dieser Tatsachen ist die Oxydation der Steroidglucoside zu den Steroidglucuroniden theoretisch durchaus denkbar.

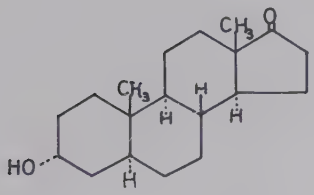
In der hier vorliegenden Arbeit wird die Synthese und anschließende Oxydation der Glucoside von Cholesterin (I), Ergosterin(II), Androstan-3α-ol-17-on (Androsteron)(III) und Δ^5-Androsten-3ß-ol-17-on (Dehydro-epi-androsteron)(IV) behandelt. Es werden Aufarbeitung, chromatographisches Verhalten und Eigenschaften der Oxydationsprodukte beschrieben.

II. Allgemeiner Verlauf von Synthese und Oxydation der Steroidglucoside

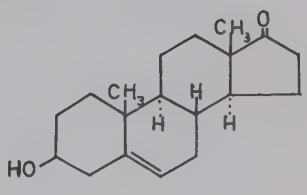
Die Synthese der Steroidglucoside erfolgt nach K o e n i g s - K n o r r[21] in starker Anlehnung an das Verfahren von M e y s t r e und M i e s c h e r[22]. α-Aceto-brom-glucose(V) wird in Gegenwart von Ag_2CO_3 in benzolischer Lösung mit dem Steroid A umgesetzt. Das entstandene Tetraacetat des Steroidglucosids B wird isoliert und der Verseifung mit Natriummethylat unterworfen. Glykosid C oxydiert man dann katalytisch nach M a r s h [20] entweder mit Platin[18] oder mit Platinkohle[19] im wäßrigen bicarbonatalkalischen Medium zum Steroidglucuronid D. Die Säure wird dadurch als Natriumsalz abgefangen. Nach Entfernen des Katalysators und Einengen der Reaktionslösung kann das rohe Oxydationsprodukt isoliert und das Steroidglucuronid charakterisiert werden. Der Verlauf der Reaktion geht aus dem Formelbild I hervor (für das Aglykon wurde zur besseren Übersicht Androsteron eingesetzt).

Nach der Regel von H u d s o n[23] erfolgt die Glykosidierung mit Halogenzuckern unter W a l d e n scher Umkehrung am C_1, wenn die funktionellen Gruppen an C_1 und C_2 der Zuckerkomponente in cis-Stellung zueinander stehen. Stehen sie in trans-Stellung, so verläuft die Kupplung ohne Umkehrung. Wir müssen bei der oben beschriebenen Synthese demnach Steroid-ß-glucoside und -ß-glucuronide erwarten.

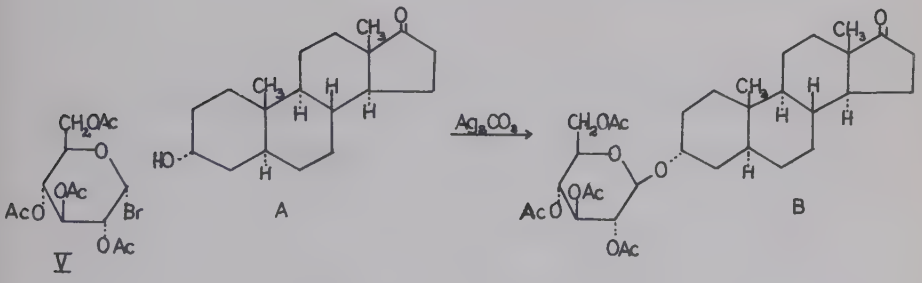


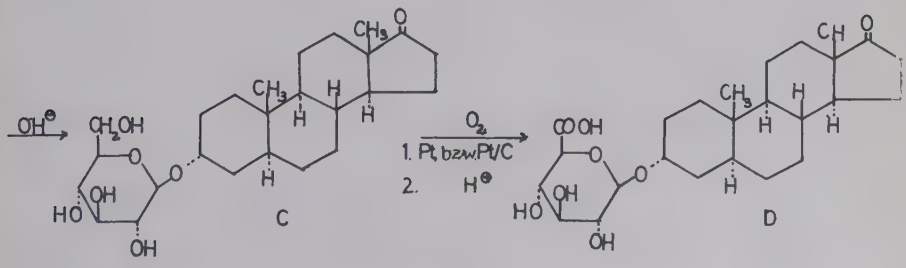


III



IV





Formelbild I

III. Darstellung und chromatographisches Verhalten der Steroidglucoside.

1.) Cholesterin-ß-D-glucosid:

Gereinigtes Cholesterin[24] wird in benzolischer Lösung mit der 1,7-fach molaren Menge an Acetobromglucose in der Siedehitze umgesetzt. Nach Entfernen des Silbersalzes und des Benzols kann aus dem Rückstand durch Umkristallisieren das Cholesteringlucosidtetraacetat(Fp 112°) in einer Rohausbeute von 58,6°/o gewonnen werden. Durch wiederholte Umkristallisation aus Äthanol gewinnt man in 36proz. Ausbeute das reine Produkt (Fp 134-136°). Die Verseifung mit Natriummethylat führt unter ziemlichen Verlusten in 18proz. Ausbeute - auf Cholesterin bezogen- zum reinen Glucosid. Aus Pyridin-Wasser umkristallisiert, erhält man es mit einem Schmelzpunkt von 275-285°. $[\alpha]_D^{20}=-48,8^\circ \pm 5^\circ$; $M_D = -267^\circ$(Pyridin); M_D(theoretisch)$=-186^\circ$. Das Produkt ist also ein ß-Glucosid.

Um die Reinheit des Produktes festzustellen, sollte das Glucosid papierchromatographiert werden. Die üblichen Lösungsmittelgemische der Literatur führten zu keinem rechten Erfolg. Nach etlichen Vorversuchen erwies sich ein Zweiphasensystem der Zusammensetzung Wasser-Methylglykol-Pyridin-Benzol-Cyclohexan(1-4-4-2-1o)(Gemisch W I) am günstigsten. Bei Verwendung der organischen Phase als Laufmittel zeigt das Cholesteringlucosid einen einheitlichen Fleck beim R_F-Wert von o,25, während das Cholesterin mit der Lösungsmittelfront läuft.

2.) Ergosterin-ß-D-glucosid:

Aus Alkohol/Benzol umkristallisiertes Ergosterin löst sich in trockenem Benzol in der Siedehitze recht gut und kann

deswegen auch wie das Cholesterin glykosidiert werden. Das bisher übliche Verfahren[25] sah eine Umsetzung in Äther mit Silberoxyd vor. Man erhält das Tetraacetat des Ergosteringlucosids nach Umkristallisation aus Alkohol in 36proz.Ausbeute, Fp 165°. Beim Verseifen des Tetraacetats in warmer äthanolischer Lösung mit Natriummethylat fällt das Glucosid aus, das aus Pyridin-Wasser umkristallisiert wird. Fp;293-297°; $[\alpha]_D^{20}$=-101,5°; M_D^{20}=-594(Pyridin); M_D(theoretisch)=-585,6. Das entstandene Ergosteringlucosid liegt also in ß-Form vor.

Die papierchromatographische Reinheit des Produktes wird im Lösunggemisch Wasser-Methylglycol-Pyridin-Cyclohexan-Pentanol(1:4:4:11:1) (Gemisch W II) nachgewiesen. Das Glucosid wandert mit der organischen Phase einheitlich bis zu einem R_F-Wert von o,1. Der R_F-Wert des Tetraacetats beträgt o,97, das Aglykon läuft mit der Lösungsmittelfront. In dem oben angegebenen Gemisch W I zeigen Tetraacetat und Glykosid den gleichen R_F-Wert von o,57.

3.) Androstan-3α-ol-17-on-ß-D-glucosid(Androsteronglucosid):

Die nach der Umsetzung von Androsteron mit Acetobromglucose eingeengte Reaktionslösung ergibt einen Sirup, der beim Aufnehmen mit Äther und Zusatz von Alkohol und etwas Benzol kristallisiert. Das in 5oproz.Ausbeute erhaltene Androsteronglucosidtetraacetat, Fp = 192°C, wird in methanolischer Lösung mit Natriummethylat entacetyliert. Nachdem man die Reaktionslösung mit Essigsäure neutralisiert hat, fällt nach Zusatz von Wasser und Einengen der Lösung das Androsteronglucosid aus. Aus Aceton/Äther umkristallisiert, erhält man 35,6% der Theorie an Glucosid(auf Androsteron bezogen). Es zeigt einen Doppelschmelz-

punkt von Fp_1= 124°C und Fp_2 = 217-225°. Der Drehwert in Chloroform, $[\alpha]_D^{20}$ =+35,4°; M_D=+16o; M_D(theoretisch)=+2o1, deutet wiederum auf ein ß-Glucosid.

Die papierchromatographische Analyse im Gemisch W II liefert die R_F-Werte für Androsteron o,7, Androsteronglucosidtetraacetat o,4 und Androsteronglucosid o,o5. Da zu vermuten ist, daß die entstandene Glucuronsäure noch einen kürzeren R_F-Wert aufweist, wurde das chromatographische Verhalten des Androsteronglucosids in den von B u s h [26] angegebenen Gemischen untersucht. Recht brauchbar sind die Gemische Butanol-NH_3 (BIa) und Toluol-Butanol-CH_3COOH-Wasser(75-25-3o-7o)(BIIa). So läuft darin das Glucosid mit einem R_F-Wert von o,93(BIa) bzw. o,29(BIIa). Noch günstiger erweist sich die Identifizierung mit der Dünnschichtchromatographie nach S t a h l [27] auf Kieselgel G.Androsteron und sein Glucosid laufen in Di-iso-propyläther mit dem R_F-Wert o,48 bzw. 0,0, in Chloroform-Aceton o,9 bzw. o,36.

4.) Δ^5-Androsten-3ß-ol-17-on-ß-D-glucosid
(Dehydroepiandrosteronglucosid).

In Abänderung des bisherigen Verfahrens zur Darstellung des Dehydro-epi-androsteronglucosids[28] erfolgte die Umsetzung nicht in Äther in der Kälte, sondern wie bei den anderen Glucosiden in siedendem Benzol. Das Tetraacetat des Glucosids erhält man in 34proz. Ausbeute. Fp.181°; $\alpha_D^{20}=\pm 7,5\pm 2,5°$(Methanol). Die Verseifung mit methanolischer KOH führt in 91,5proz. Ausbeute(Rohausbeute 99,5%)zum gewünschten Dehydroepiandrosteronglucosid, Fp.223-226,5°. Der Drehwert, $[\alpha]_D^{20}$=-6,o±o,5; M_D= =-26,8(Methanol); M_D(theoretisch)=-31,9,spricht wiederum für eine ß-Glucosidierung.

Die papierchromatographische Analyse im Gemisch W II ergibt für Dehydroepiandrosteron und das Tetraacetat des Glucosids keinen Unterschied in den R_F-Werten(o,5);im Gemisch BIIa liegen die entsprechenden Werte bei o,42 und o,21. Bessere Trenneffekte erzielt man wiederum mit der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G, die eine Identifizierung von Dehydroepiandrosteron, Tetraacetat und Glucosid nebeneinander ermöglicht. In i-Propyläther betragen die R_F-Werte o,44 bzw. o,24 bzw. o,o, dagegen in Chloroform-Aceton 1,o, o,9 und o,27. Auch die dünnschichtchromatographische Trennung an Aluminiumoxyd G in i-Propyläther-Aceton 9:1 ergibt eine Trennung: o,75 (Aglykon) und o,53(Tetraacetat). Läßt man anschließend Pyridin bis zur Hälfte des Chromatogramms laufen, so beträgt der R_F-Wert für das Glucosid o,41. Auf Grund dieser Erfahrung ist es möglich, den Verseifungsansatz eines Rohfiltrates vom Tetraacetat aufzuarbeiten. Durch Chromatographie an einer Al_2O_3-Säule können nichtumgesetztes Dehydroepiandrosteron, nichtverseiftes Tetraacetat und Dehydro-epi-androsteronglucosid von Glucose und voneinander getrennt und zurückgewonnen werden.

Testan-3α-ol-11,17-dion-(Ätiocholanolon).

Die Umsetzung von Ätiocholanolon mit Acetobromglucose nach dem Verfahren von M e y s t r e und M i e s c h e r[22] führten zu keinem nennenswerten Erfolg. Man gewann aus der Reaktionslösung nichtumgesetztes Ausgangsmaterial zurück.

IV. Oxydation und Oxydationsprodukte der Steroidglucoside.

1.) Oxydation von Cholesterin-ß-D-glucosid.

Anhand der Umsetzung mit Cholesterin-ß-glucosid wurde die Reaktionsfähigkeit des Glucoseanteils der Steroidglucoside gegenüber katalytisch erregtem Säuerstoff untersucht. Aus einer Vielzahl von Versuchen ermittelte man außerdem die geeigneten Reaktionsbedingungen.

Auf Grund der schlechten Lösungseigenschaften des Cholesteringlucosids, das nur in Pyridin und heißem Dioxan gut löslich ist, entschied ich mich zu einer Umsetzung in Wasser bei 90°C. Sowohl das Glucosid als auch der Platin-Katalysator[18] liegen zunächst in Suspension vor. Im Verlauf der Reaktion löst sich das eingesetzte Glucosid mehr und mehr auf. Durch Zusatz von $NaHCO_3$ wird eine schwache alkalische Reaktionslösung gewährleistet. Unter sehr kräftigem Rühren leitet man durch eine Kapillare O_2 ein und verfolgt den Ablauf der Reaktion durch potentiometrische Titration. Von Zeit zu Zeit wird der Katalysator erneuert, da nichtumgesetztes Glucosid durch Anlagerung den Katalysator leicht blockieren kann.

Nach acht Stunden ist die Oxydation beendet, die Lösung wird zur Entfernung des Katalysators heiß filtriert und anschließend im Vakuum eingeengt. Nach Zusatz eines Überschusses $\frac{n}{10}$ HCl schüttelt man das ausgefallene Oxydationsprodukt mit methanolhaltigem Chloroform aus. Die organische Phase enthält nach Trocknen über Na_2SO_4 45% Rohprodukt. Nach mehrfachem Umfällen aus heißem Äthanol gewinnt man ein Oxydationsprodukt vom Fp 272-274°C. Im Gemisch W I zeigt es einen R_F-Wert von o,1 und ergibt positive Reaktionen nach L i e b e r m a n n -

B u r c h a r d[29] und mit Naphthoresorcin[30].

Da das entstandene Glucuronid nur amorph anfällt, versucht man, ein kristallines Derivat darzustellen. Das Oxydationsprodukt wird in äthanolischer Lösung in der Hitze mit N,N'-Dibenzyläthylendiamin umgesetzt. Aus Methanol-Essigester-Petroläther kristallisieren zunächst feine Nadeln vom Fp 132°C aus. Die L i e b e r m a n n - B u r c h a r d Reaktion ist positiv. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther erhält man ein kristallines Derivat der Cholesteringlucuronsäure mit dem Fp 242-245°C.
Die Umsetzung der alkoholischen Lösung des Oxydationsproduktes mit Cinchonin führt nach Abfiltrieren der überschüssigen Base und mehrfachem Umkristallisieren aus Methanol-Aceton-Wasser zum Cinchoninsalz des Cholesterin-glucuronids, Fp = 237-242°C. Der R_F-Wert im Gemisch W I beträgt o,42; die Reaktionen mit Naphthoresorcin und nach L i e b e r m a n n - B u r c h a r d verlaufen positiv.

2.) Oxydation des Ergosterin-ß-D-glucosids.

Wie beim Cholesteringlucosid wird auch hier die Oxydation in wäßriger Suspension vorgenommen. Nach Zugabe des frisch bereiteten Platin-Katalysators, läßt man das Glykosid bei 6o-7o°C 2o 1/2 Stunden mit O_2 reagieren. Aus der potentiometrischen Titration, die den Verlauf der Oxydation verfolgt, ergibt sich eine 27proz. Ausbeute an Ergosteringlucuronsäure. Nach Abfiltrieren der Lösung und Einengen im Vakuumrotationsverdampfer fällt man das Oxydationsprodukt mit verdünnter HCl aus. Es wird sofort abzentrifugiert und an der Zentrifuge mehrmals mit Wasser gewaschen. Das so erhaltene rohe Oxydationsprodukt zeigt zwar eine positive Naphthoresorcin-Probe, jedoch die papierchromatographische Analyse ergibt kein einheitliches Produkt. Im Ge-

misch W II treten sehr viele Flecke auf:o,o4;o,18;o,67;o,82; (Glykosid o,17). Dies deutet darauf hin, daß neben der Oxydation zur Glucuronsäure auch ein Angriff des Sauerstoffs auf das konjugierte Diensystem des Ergosterins erfolgt und damit zu einer Vielzahl von Oxydationsprodukten führt. Da auch bei der Darstellung des Cinchoninsalzes sehr viele Produkte auftreten, wird von einer Weiterverarbeitung abgesehen.

3.) Oxydation von Androstan-3α-ol-17-on-ß-D-glucosid

a) Die Oxydation des Glucosids:

Da die Löslichkeitseigenschaften des Androsterongluco-sids wesentlich besser als die der beiden anderen Glykoside sind, lassen sich bequemere Aufarbeitungs- und Bearbeitungsmethoden erwarten. Es ist in warmem Wasser gut löslich. Die Oxydation findet also nicht mehr am suspendierten, sondern am gelösten Glucosid statt. Anhand der papierchromatographischen Analyse kann man nachweisen, daß die Umsetzung bei niedriger Temperatur recht langwierig ist. Läßt man die Oxydation bei 6o°C ablaufen, tritt erst nach 22 Stunden auf dem Chromatogramm neben dem Glykosid ein 2. Fleck auf(Gemisch BIIa=Start und Gemisch BIa=o,o9). Aus diesem Grunde werden die Reaktionen im Temperaturbereich von 7o-8o°C durchgeführt. Dabei richtet sich die Oxydationsdauer nach der Menge des eingesetzten Materials. Sie beträgt rund 5o bis maximal 1oo Stunden. Als Katalysator dient frisch bereitete Platinkohle, die zu Beginn und im Verlauf der Reaktion protionsweise zugesetzt wird. Auch hier wird $NaHCO_3$ wiederholt zugesetzt, um ein allzu starkes Absinken des pH-Wertes zu vermeiden. Unter kräftigem Rühren leitet man dann einen schwachen Sauerstoffstrom durch eine Kapillare in die Reaktionslösung ein. Nach kurzer Reaktionsdauer beginnt die

Lösung stark zu schäumen, ein Zeichen, daß die Umsetzung begonnen hat. Zur laufenden Kontrolle wird außer der Untersuchung mit Spezial-pH-Papier die Dünnschichtchromatographie im System Aceton/Chloroform herangezogen. Das Oxydationsprodukt bleibt im Gegensatz zum Androsteronglucosid(R_F=o,25) am Start. Sobald sein Anteil überwiegt, wird die Reaktion abgebrochen.

b) Aufarbeitungsmethoden

Die Lösung wird abfiltriert und im Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Nachdem man den Rückstand mit heißem Wasser aufgenommen hat, kristallisieren aus der abkühlenden Lösung feine Nadeln aus. Im Dünnschichtchromatogramm erweisen sie sich als Ausgangsglykosid. Die zurückbleibende alkalische Mutterlauge schüttelt man mehrmals mit Essigester aus. Aus der von den gröbsten Verunreinigungen befreiten, eisgekühlten Lösung gewinnt man nach Ansäuern mit n HCl und Ausestern 5o% rohes, getrocknetes Oxydationsprodukt. Das Dünnschichtchromatogramm zeigt nach den R_F -Werten: o,o(o,14;o,34;o,68 in Spuren)o,8 immer noch kleine Verunreinigungen. Deswegen wird der Rückstand mit 2n Na_2CO_3-Lösung aufgenommen, erneut in der Kälte angesäuert und ausgeestert. 8o% des eingesetzten Produktes erhält man als dünnschichtchromatographisch einheitliche Substanz zurück.

Nun liegt es nahe, die Oxydationslösung über einen H^+-Ionenaustauscher zu geben, um sie vom Natriumbicarbonat zu befreien. Leider ist auf diesem Wege noch keine Reindarstellung der freien Säure möglich, da im Eluat noch das Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure vorliegt.

Eine weitere etwas verlustreiche Aufarbeitungsmethode basiert auf den Erfahrungen der Dünnschichtchromatographie.

Das rohe Oxydationsprodukt kann an Silicagel von Androsteron und Androsteronglucosid grob getrennt werden. Die hierbei verwendete Lösungsmittelreihe besteht aus Chloroform-Aceton,Aceton, Aceton-Methanol(8:1;8:2 und 1:1), Methanol und Methanol-CH_3COOH(1-1o%). Alle Fraktionen, die das Oxydationsprodukt enthalten, ergeben nach mehrmaligem Umfällen eine Ausbeute von 3o%, bezogen auf eingesetztes Glucosid. Sie werden nach Ansäuern mit HCl ausgeestert und liefern in 36proz. Ausbeute, bezogen auf umgefälltes Oxydationsprodukt, brauchbares Untersuchungsmaterial.

Der zum Ausschütteln der alkalischen Reaktionslösung (Seite 12) verwendete Ester zeigt bei der chromatographischen Analyse mit der Dünnschichtplatte sehr viele Substanzen. Die R_F-Werte im System Chloroform-Aceton sind:o,o(stark);o,o75; o,11;o,23(Glykosid);o,28,o,33;o,42;o,52;o,8 und 1,o(stark). Zur weiteren Identifizierung läßt man die ausgeesterte Substanz in Di-iso-propyläther laufen. Die in diesem Dünnschichtchromatogramm auftretenden Hauptflecke liegen außer am Start bei den R_F-Werten o,45;o,79 und o,9. Das nichtgewanderte Material setzt sich aus Glucosid und Oxydationsprodukt zusammen. Im Vergleichschromatogramm läuft Androsteron bis zum R_F-Wert o,45. Zunächst vermute ich, daß die weiterlaufende Substanz Androstandion sei. Durch chromatographischen Vergleich mit aus Androsteron dargestelltem Androstan-3,17-dion kann diese Annahme bestätigt werden. Das Auftreten von Androsteron und Androstandion zeigt uns, daß während der Umsetzung mit Sauerstoff nicht nur eine Oxydation zum Androsteronglucuronid stattfindet. Unter den Reaktionsbedingungen, die zu einer guten Oxydationsausbeute führen, wird trotz des schwach alkalischen Milieus die Glykosidbindung

gespalten. Das freigesetzte Androsteron wird dann am C_3 zum Androstandion oxydiert. Es ist anzunehmen, daß sowohl Glucosid als auch Glucuronid der Spaltung unterliegen. Bei der papierchromatographischen Untersuchung der Mutterlauge des Oxydationsproduktes(Seite 12) in Lutidin findet man nebeneinander freie Glucose und Glucuronsäure. Die Beständigkeit der Androsteronglucuronsäure scheint, nach den von mir gemachten Erfahrungen, nicht sehr groß zu sein. Bei längerem Aufbewahren der Lösung oder beim Aufarbeiten der Oxydationsprodukte treten immer wieder Spuren Androsteron auf und erschweren die Isolierung der Androsteronglucuronsäure.

Der von der Reaktionslösung abfiltrierte Katalysator wird ebenfalls aufgearbeitet. Nach Ausschütteln mit Butanol und Einengen der organischen Phase wird der anfallende Rückstand mit Alkali aufgenommen und ausgeestert. Die chromatographische Analyse auf der Dünnschichtplatte im System Chloroform-Aceton ergibt folgende R_F-Werte:o,o(stark);o,o5;o,11;o,16;(stark,Glucosid R_F=o,16);(o,2;o,3 Spuren);o,51;o,6;o,73;o,88. Aus der alkalischen Lösung gewinnt man durch Ansäuern und Ausestern brauchbares Oxydationsprodukt.

Bei der Aufbereitung der Mutterlauge des Oxydationsproduktes (Seite 12) wird durch Extraktion mit Butanol neben der bereits erwähnten Glucose und Glucuronsäure auch noch Androsteronglucuronsäure isoliert.

c) Analyse des Oxydationsproduktes:

Das durch die Aufarbeitungsmethoden gewonnene rohe Oxydationsprodukt (Seite 12) wird zunächst einmal analytisch untersucht. Neben quantitativer Bestimmung mit Naphthoresorcin nach F i s h m a n[31] werden auch qualitative Methoden zur

Untersuchung herangezogen. Besonders eignet sich die Naphthoresorcinprobe nach B r y s o n[30] zur Identifizierung der Glucuronide im Dünnschichtchromatogramm. Sie gelingt wesentlich einwandfreier als auf Chromatographiepapieren.

Ferner sollte nach der Hydrolyse des Oxydationsproduktes freie Glucuronsäure im Papierchromatogramm nachweisbar sein. Die Hydrolyse des zu untersuchenden Materials erfolgt mit 6n H_2SO_4 auf dem Wasserbad. Nachdem das Aglykon ausgeäthert ist, wird mit $BaCO_3$ neutralisiert, die wäßrige Lösung eingeengt und papierchromatographisch untersucht. In den üblichen Lösungsmittelgemischen für Zucker ist eine eindeutige Unterscheidung von Glucose und Glucuronsäurelacton nicht möglich. Dagegen eignet sich wassergesättigtes 2,4-Lutidin sehr gut zur Trennung dieser beiden Kohlenhydrate. Glucuronsäurelacton hat einen R_F-Wert von o,92, Glucose von o,67 und das Natriumsalz der Glucuronsäure von o,2. Entsprechend liegt der R_F-Wert der wäßrigen Lösung des Spaltansatzes bei o,2. Es tritt ein kleiner Nebenfleck von o,9 auf, der nach der Methode von T r e v e l y a n[32] mit $AgNO_3$ in Aceton nachweisbar ist. Das deutet darauf hin, daß noch Spuren Androsteronglucosid vorhanden sind.

d) Chromatographie des Oxydationsproduktes:

Untersucht man das im Dünnschichtchromatogramm einheitliche Produkt auf dem Papierchromatogramm, so findet man keinen einheitlichen Fleck. In dem abgeänderten B u s h gemisch BIa mit der Zusammensetzung Butanol-Toluol-2n NH_3(4:1:5)(WIII)treten folgende R_F-Werte auf:1. =o,47, 2. =o,33, 3. =o,24, 4. =o,o4. Alle Fraktionen reagieren mit m-Dinitrobenzol/KOH(Z i m m e r m a n n -Reaktion[33]) positiv. Die Fraktionen B und D ergeben mit Naphthoresorcin eine positive Reaktion, A und B mit $SbCl_3$

und C außerdem nach langem Stehen mit $AgNO_3$. Chromatographiert man das rohe Oxydationsprodukt quantitativ an der Cellulose-Säule mit WIII, so erhält man 5 Fraktionen in folgenden Ausbeuten: A = 5%, B = 20%, C = 9%, D = 20% und E = 46%. Fraktion B hat nach F i s c h m a n einen 35proz. Glucuronsäuregehalt. Sie muß deswegen noch einmal chromatographiert werden und ergibt wiederum 5 Fraktionen (die R_F-Werte der Hauptanteile stehen in Klammern):BI ca.1% (o,95),BII = 15% (o,78), BIII = 5%, BIV = 48% (o,4o), BV = 3o% (o,2o).

In der chromatographischen Analyse mit Dünnschichtplatten ist das Gemisch Chloroform/Aceton zur Identifizierung der Oxydationsprodukte nicht geeignet. Es werden darum erneut Untersuchungen aufgenommen, um ein besseres Lösungssystem zu finden. In früheren Versuchen wurde das Verhalten in Methanol, Butanol und Mischungen dieser Alkohole mit anderen Lösungsmitteln untersucht. Sie führten immer zu einer Verwaschung der Flecke. Als sehr günstig erweist sich die leichte Phase eines abgeänderten B u s h gemisches der Zusammensetzung Toluol-Butanol-1,3n NH_3 (1:4:5)(WIV). Die im System Chloroform/Aceton am Start bleibende Substanz wird in 3 Flecke aufgeteilt. Sie stehen mit den R_F-Werten der Cellulosesäulefraktionen in folgendem Zusammenhang:

	R_F Papierchromatogramm	Dünnschichtchromatogramm
Androsteronglucosid	o,9	o,54
BII	o,5-o,75	o,o8
BIV	o,4	o,23
BV	o,2	o,o

e) Produkt S III

In der oben angeführten Tabelle ist das abnorme Verhalten der Fraktion BIV im Dünnschichtchromatogramm auffallend. Auf Grund dieser Ergebnisse müßte es möglich sein, diesen im Dünnschichtchromatogramm schneller laufenden Begleiter abzutrennen. Tatsächlich gelingt es, durch Chromatographie an einer Silicagelsäule aus den zusammengefaßten Fraktionen A,BI, BIII, C und D(Seite 16) 22% eines Produktes SIII mit den R_F-Werten o,16(Dünnschichtplatte) und o,45 (Papierchromatogramm) zu isolieren. Das Produkt entspricht der Fraktion BIV. SIII ergibt nach nochmaliger Chromatographie keine positive Naphthoresorcinprobe, zeigt auf der Dünnschichtplatte mit Chlorsulfonsäure eine rote statt der bisher üblichen blauen Färbung und mit Anthron/H_2SO_4 eine schwache Grünfärbung. Mit Benzidin/Perjodat ergibt es eine positive Reaktion. Dies beweist, daß die Glykosidstruktur noch vorhanden ist. SIII ist in Alkali löslich, jedoch nicht in Wasser. Eventuell ist es doch eine organische Säure, wenn auch keine Glucuronsäure. Aus Aceton-Äther-Cyclohexan kristallisiert es in feinen Nadeln vom Fp: 1o3-1o9° aus. Im IR-Spektrum(Seite 26) unterscheidet es sich vom Glykosid hauptsächlich durch eine Schulter bei 179o cm^{-1}.

f) Androsteronglucuronsäure und ihre Salze:

Die vom Glykosid und dem Produkt SIII befreiten Fraktionen enthalten zwei Produkte. Nach Aufnehmen mit Na_2CO_3 und dem üblichen Ausestern findet man im Dünnschichtchromatogramm die R_F-Werte o,o9 und o,o, auf dem Papierchromatogramm o,45 und o,32. Beide Flecke ergeben positive Reaktionen nach Z i m m e r m a n n und mit Naphthoresorcin. Es ist demnach anzunehmen,

daß die beiden vorliegenden Produkte die Androsteronglucuronsäure und deren Natriumsalz sind. Bei Behandlung des Gemisches mit Ester bleibt ein Rückstand, der nach mehrfachem Umfällen aus Methanol/Äther im Dünnschichtchromatogramm am Start bleibt und im Papierchromatogramm einen R_F-Wert von o,14 aufweist. Wird der Rückstand mit Essigester versetzt, so bilden sich feine Nadeln, die bei 2o5°C unter Verkohlung schmelzen. Die Verbrennung auf dem Spatel liefert einen alkalisch reagierenden Rückstand. Die Nadeln sind in Wasser gut löslich und zerfließen leicht an feuchter Luft. Mit Violursäure reagiert das Produkt auf dem Papierchromatogramm mit violetter Farbe bei einem R_F-Wert von o,14. Die Z i m m e r m a n n reaktion und der Test mit Naphthoresorcin verlaufen positiv. Die quantitative Bestimmung nach F i s h m a n ergibt 96proz.Gehalt an Glucuronsäure. Das Natriumsalz hat den Drehwert: $[\alpha]_D^{2o}$ =+38,5° ±5,5°. Im IR-Spektrum sieht man die typische Carboxylatbande bei 6,18μ(CaF_2-Prisma) (Seite 26).

Aus dem Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure sollte man die freie Säure leicht gewinnen können. Behandelt man es mit Salzsäure, so wird sie jedoch nicht vollständige freigesetzt. Eine Spur Natriumsalz tritt immer noch im Esterauszug der angesäuerten Reaktionsprodukte auf. Trotz größter Vorsichtsmaßregeln kann dabei das Auftreten des Aglykons nicht verhindert werden. Die Aufarbeitung der freien Säure wird dadurch sehr erschwert. So bewirkt die Anwesenheit von Androsteron und anderen Begleitstoffen eine Verschiebung der Löslichkeit der Oxydationsprodukte. Versucht man zum Beispiel, das in Äther lösliche Androsteron aus dem Gemisch zu entfernen, so werden Natriumsalz und freie Androsteronglucuronsäure

im Ätherauszug gefunden. Die Trennung des Natriumsalzes von der freien Säure mit Essigester erfolgt nur einseitig. Man bekommt zwar gereinigtes Natriumsalz als Rückstand, das Filtrat enthält aber sowohl Säure als auch Salz.

Es liegt nun nahe, die wäßrige bzw. wäßrig-methanolische Lösung über einen schwachsauren Ionenaustauscher zu geben. Bei der Behandlung mit Amberlite IRC 5o tritt nur eine mäßige Umsetzung zur Säure ein. Das Eluat enthält wiederum Glucuronid und Salz. Gibt man das mit Alkali aufgenommene Oxydationsprodukt in Wasser-Methanol über den Austauscher, so wird nur überschüssiges Alkali entfernt. Aus dem Eluat gewinnt man reines Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure.

Aus einem anderen Oxydationsansatz erhält man bei der Chromatographie an einer Cellulose-Säule mit dem Gemisch WIV eine Fraktion C, die einen 96proz. Steroidglucuronsäure-Gehalt aufweist. Nach erneutem Chromatographieren isoliert man aus dieser Fraktion Kristalle vom Schmelzpunkt 146-148°. Das Papierchromatogramm zeigt in WIV den R_F-Wert o,75, auf dem Dünnschichtchromatogramm, mit der leichten Phase von WIV chromatographiert, ergibt Fraktion C sowohl mit Naphthoresorcin als auch mit Chlorsulfonsäure einen einheitlichen Fleck beim R_F-Wert von o,o9. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Essigester-Cyclohexan schmilzt die freie Säure bei 168-17o°C.

Zur weiteren Identifizierung des Oxydationsproduktes wird versucht, das Barium- und Cinchoninsalz der Androsteron-glucuronsäure darzustellen. Im Gemisch BIa zeigt das Bariumsalz, Schmelzpunkt 23o°, einen R_F-Wert on o,62. Trotz mehrfachen Umkristallisierens enthält es aber noch überschüssiges Barium.

Die Darstellung des Cinchoninsalzes der Androsteronglucuronsäure wird aus dem Natriumsalz in Gegenwart von HCl vorgenommen. Aus Methanol-Wasser mehrmals umkristallisiert, erhält man chromatographisch einwandfreies Salz mit dem R_F-Wert von o,86 im System BIa (Glykosid o,94). Der Schmelzpunkt des isolierten Produktes beträgt 15o-16o°C. Im IR-Spektrum (Seite 25) tritt die typisch breite Carboxylatbande bei 6,25μ auf, in die eine scharfe Bande des Cinchonins hineinragt.

4.) Oxydation vonΔ^5-Androsten-3ß-ol-17-on-ß-D-glucosid

a) Oxydation und Aufarbeitung:

Die Oxydation des Dehydro-epi-androsteron-ß-glucosids wird ebenfalls in bicarbonatalkalischer, wäßriger Lösung vorgenommen. Sie erfolgt mit Platinkohle bei einem pH von 8 und wird nach 54 Stunden beendet. Der Verlauf der Reaktion wird durch pH-Messung und Dünnschichtchromatogramm verfolgt. Am Ende der Umsetzung liegt das Ausgangsmaterial nur noch in Spuren vor. Die R_F-Werte betragen in Chloroform-Aceton für das Glucosid o,14 und für das Oxydationsprodukt o,o2.

Nachdem der Katalysator entfernt ist, wird die Reaktionslösung eingeengt, mit wenig Wasser aufgenommen und mit Chloroform ausgeschüttelt. Danach säuert man die eisgekühlte, wäßrige Lösung mit HCl schwach an und estert das ausgefällte Oxydationsprodukt aus. Die Dünnschichtchromatographie ergibt wiederum nur einen Fleck am Start. Wird die eingeengte Esterphase mit Äthanol aufgenommen, so erhält man einen Rückstand mit einem Schmelzpunkt von über 36o°C. Die papierchromatographische Analyse des Filtrates ergibt im Gemisch Butanol-

-2n NH_3(BIa) 4 Flecke bei den R_F-Werten o,94;o,77;o,33 und o,22. Das Produkt mit dem R_F-Wert o,77 wird mit Naphthoresorcin am stärksten angefärbt. Bei der quantitativen Chromatographie an einer Cellulosesäule erhält man 5 brauchbare Fraktionen in folgender Ausbeute. Vorlauf: 24%(R_F=o,95;o,77),A:37%(R_F=o,7; o,45), B:4%(R_F=o,3), C:3% und D:19%(R_F =o,2). Die Dünnschichtchromatogramme der Fraktionen A-D zeigen die gleiche Anzahl von Produkten. Man gibt deshalb die vom Ausgangsmaterial befreiten Fraktionen A-D zusammen, nimmt sie, nachdem man eingeengt hat, mit $\frac{n}{10}$ NaOH auf und schüttelt mit Ester aus. Das Papierchromatogramm der Esterlösung zeigt Substanzen folgender R_F-Werte an: o,19;o,79;o,86(stark);o,93. Die alkalische Lösung wird in der Kälte mit n HCl angesäuert undddas ausgefällte Oxydationsprodukt mit Ester aufgenommen. Das in 38proz. Ausbeute isolierte Produkt hat auf dem Dünnschichtchromatogramm nur einen Fleck am Start. Aus der wäßrigen Phase der Mutterlauge gewinnt man nocht 6% Material mit den R_F-Werten: o,o(stark);o,14;o,23 und o,39.

b) Dehydro-epi-androsteronglucuronsäure und ihr Natriumsalz.

Das isolierte Oxydationsprodukt wird mit Äther gewaschen. Dabei bleibt ein Rückstand von 33%, der, aus Aceton-Äther umkristallisiert, nach F i s h m a n 7o% Glucuronid enthält. Die chromatographische Analyse auf der Dünnschichtplatte mit dem System WIV zeigt Flecke am Start und bei o,o7 und auf dem Papierchromatogramm im Gemisch BIa bei o,21 und o,41. Auf der Dünnschichtplatte reagieren beide mit Naphthoresorcin positiv. Es liegen auch hier wiederum das Natriumsalz und die freie Dehydro-epi-androsteronglucuronsäure vor. Um sie voneinander zu trennen, wird das eingeengte Produkt mit $\frac{n}{10}$ NaOH aufgenommen.

Man schüttelt die Lösung mit Äther aus und gibt die von Äther befreite Lösung über Amberlite IRC 5o. Nach Einengen des Eluats und mehrfachem Behandeln mit Essigester erhält man in 7oproz. Ausbeute vorwiegend freie Dehydro-epi-androsteronglucuronsäure, deren R_W-Wert im Papierchromatogramm bei o,4 und im Dünnschichtchromatogramm bei o,o6 liegt. Daneben ist immer noch etwas Natriumsalz vorhanden(Dünnschicht R_F = o,o). Die Proben nach Z i m m e r m a n n und mit Naphthoresorcin verlaufen positiv. Nach mehrfachem Umkristallisieren aus Essigester-Äther-Cyclohexan ergibt die quantitative Bestimmung nach F i s h m a n einen 1ooproz. Gehalt an Glucuronid. Der Fp liegt zuerst bei 135-139°C. Beim Schmelzen bleibt aber ein kleiner Rückstand. Nochmals umkristallisiert hat die Säure einen Fp von 186-189°.

Die ätherische Lösung des isolierten Oxydationsproduktes (Seite 21) zeigt im Dünnschichtchromatogramm die beiden Hauptprodukte (R_F:o,o und o,1) und Spuren bei o,3 und o,9. Der Glucuronsäuregehalt beträgt nur 38%. Aus Aceton-Äther-Cyclohexan fällt man ein Produkt mit dem Fp 11o-115°C, das folgendes Chromatogramm aufweist:R_F:o,o;o,o7(o,24;o,29 in Spuren). Mit Essigester versucht man nun die beiden Hauptprodukte zu trennen. Das gelingt recht gut, denn der anfallende Rückstand hat im Dünnschichtchromatogramm einen Fleck am Start, während beim Esterauszug die R_F-Werte am Start und bei o,o4 liegen. Der Rückstand wird mehrmals aus Methanol-Äther umgefällt. Die quantitative Analyse nach F i s h m a n ergibt einen 1ooproz. Gehalt an Natriumsalz der Dehydro-epi-androsteronglucuronsäure. Der R_F-Wert im Papierchromatogramm beträgt o,23(Spur o,36), der Drehwert $[\alpha]_D^{12,8}$ =-9,5°±2°. Bei der Bestimmung des Schmelz-

punktes tritt bei 2oo°C Verkohlung ein. Mit Violursäure reagiert das Produkt auf dem Papierchromatogramm positiv. Im IR-Spektrum(Seite 27) findet man die für die Glucuronsäure-Salze charakteristische breite Bande bei 6,18μ (CaF_2-Prisma).

5.) Die Infrarotspektren:

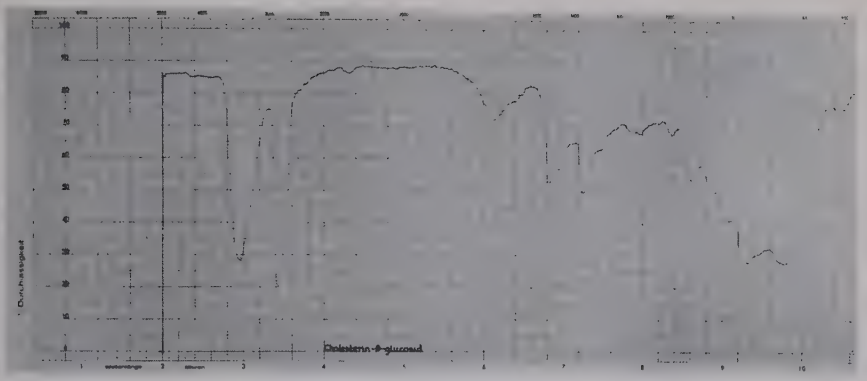
Von den Steroidglykosiden und den isolierten Salzen der Oxydationsprodukte werden auf Seite 25-27 die IR-Spektren wiedergegeben. Die in der Literatur vorhandenen Spektren[35] wurden nur von acetylierten Steroidglucuronsäure-estern aufgenommen. Deswegen konnten sie nicht zum Vergleich herangezogen werden. Lediglich die von W o t i z[35] angegebenen Banden für die ß-Glykosidbindung zwischen 1ooo und 11oo cm^{-1} stimmen mit den in meinem Glykosidspektren auftretenden Banden überein:Cholesteringlucosid 11oo cm^{-1},Dehydro-epi-androsteronglucosid 11o2 cm^{-1} und Androsteronglucosid 11oo cm^{-1}. Das ist ein weiterer Beweis für die Annahme, daß bei der Umsetzung mit α-Aceto-bromglucose eine ß-Glykosidierung stattfindet.

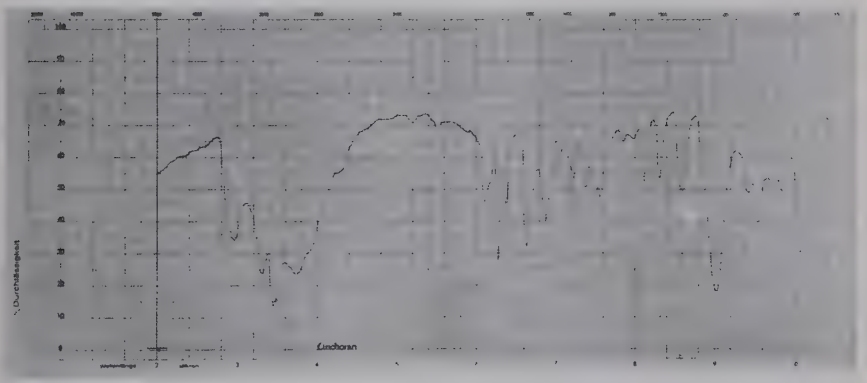
Zum Vergleich der Natriumsalze der Steroidglucuronsäuren wird das Spektrum des Natriumglucuronats aufgenommen. Nach B r ü g e l[36] tritt für das $R\text{-}COO^-$-Ion eine charakteristische Bande im Bereich von 6,2-6,4μ auf. Dieser für eine C=O-Bande hohe Wert deutet auf den Resonanzeffekt $^-O\text{-}CR{=}O \longleftrightarrow O{=}CR\text{-}O^-$ hin. Die beiden ursprünglich streng unterschiedenen Bindungen des Sauerstoffs an das C-Atom lassen sich dadurch nicht mehr einzeln charakterisieren. Die Bande um 6,3μ ist nur eineKomponente des Paares, dessen anderer Teil bei etwa 7,oμ auftritt. Häufig ist diese Bande aber von CH-Deformationsschwingungen überlagert. Diese Erörterung stimmt mit dem Auftreten der Banden des Natriumglucuronats bei 6,28μ (1593cm^{-1})und bei 7,oμ (143ocm^{-1}) gut überein. Auch das IR-Spektrum des Natriumsalzes der Valerian-

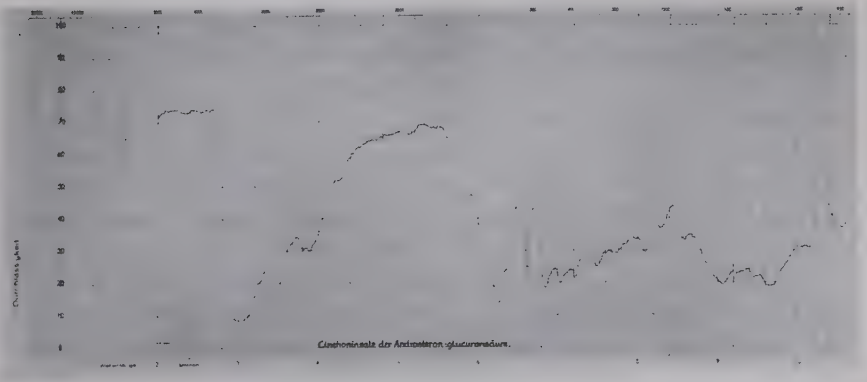
säure[37] zeigt die Banden bei 6,42μ($1560cm^{-1}$) und 7,06μ($1425cm^{-1}$) in dem angegebenen Bereich. Vergleicht man die Spektren der Natriumsalze der Steroidglucuronsäuren mit den der Ausgangsglucoside, so fällt auf, daß gerade in diesem Gebiet sowohl beim Androsteron- als auch beim Dehydro-epi-androsteron-glucuronat eine starke Bande bei 6,18μ($1620cm^{-1}$) auftritt. Die Bande bei 7,12μ(Androsteron) bzw. 7,10μ(Dehydro-epi-androsteron) findet man schon im Spektrum des Glucosids. In den Natriumsalzen liegt sie nur verstärkt vor. Gleiche Verhältnisse hat man beim Cinchoninsalz der Androsteronglucuronsäure. In dessen IR-Spektrum liegt eine breite Bande bei 6,26μ($1600cm^{-1}$), die durch eine Bande des Cinchonins eine eigenartige Form erhält.

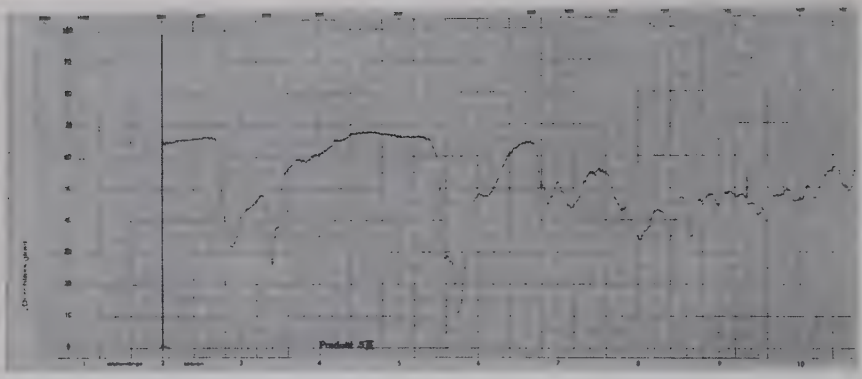
Das hier vorliegende IR-Spektrum des Cholesteringlucosids stammt von einem Produkt, das aus einem Oxydationsansatz wieder zurückgewonnen wurde. Die schwache C=O-Bande bei 6,16μ mag von dem als Begleitsubstanz auftretenden Cholesteringlucuronid stammen. Die anderen Banden bei 3,42(3,4); 6,8(6,8); 7,26(7,3)μ treten auch im IR-Spektrum des Cholesterins[38] auf (Cholesterinwerte in Klammern).

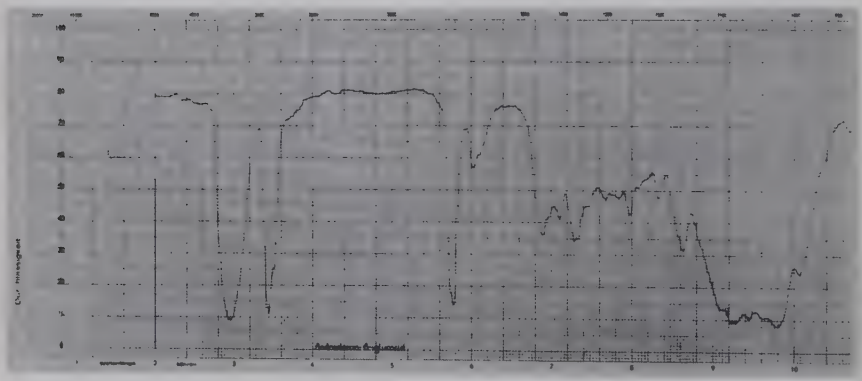
Das Spektrum des Produktes SIII unterscheidet sich von dem des Androsteronglucosids durch eine Schulter im C=O-Bereich bei 5,6μ($1790cm^{-1}$). Sie ist gegenüber der 17-Keto-Bande bei 5,75μ etwas zum kurzwelligen Bereich verschoben. Das deutet wahrscheinlich auf ein 4-Ring-Keton, bzw. eine γ-Lacton-Gruppierung(5,65μ) oder auf eine Carbonsäure hin(5,65-5,8μ). Möglicherweise ist während der Oxydation ein Abbau der Zuckerkomponente zur nächstniederen Säure erfolgt. Da aber die Naphthoresorcinprobe negativ ausfällt, muß diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Andererseits spricht für eine Carbonsäure das Verhalten von S III gegenüber Alkali (siehe Seite 17). Es kann natürlich auch im Ring A des Steroidgerüstes eine Veränderung vorgegangen sein.

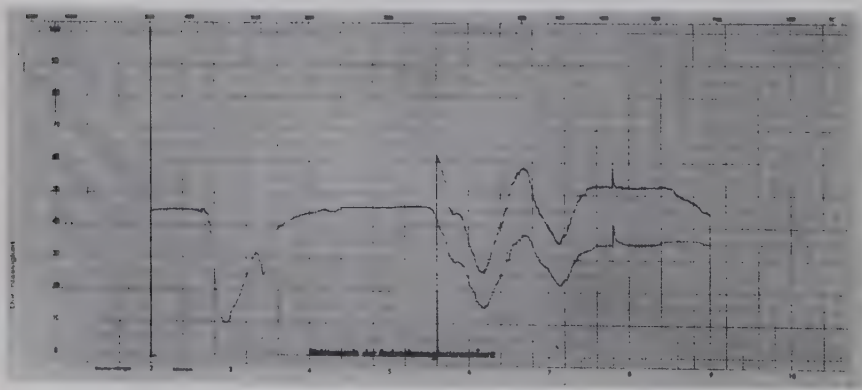

Cholesterin-β-glucosid

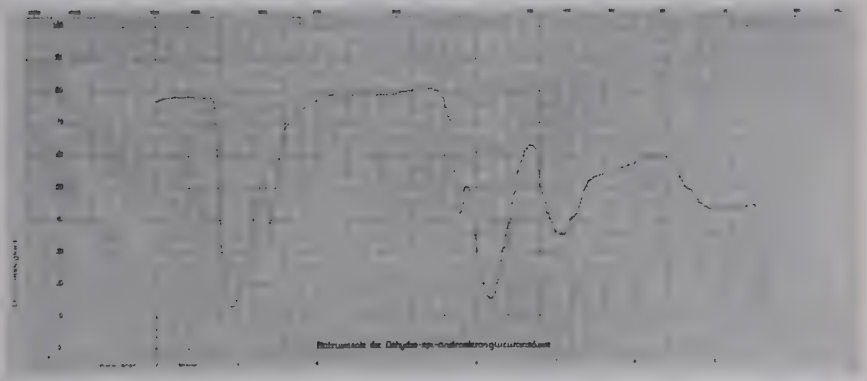

Cinchonin

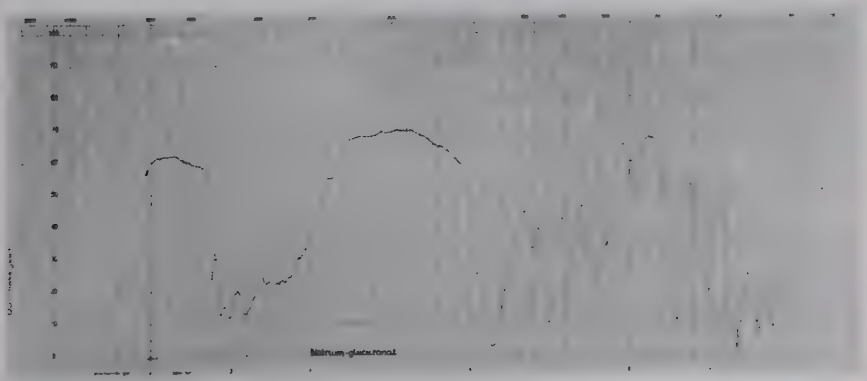

Cinchoninsalz der Androsteron-glucuronsäure.











6.) Vergleich der Darstellungsmethoden von Steroid-glucuronsäuren.

Die zu Beginn meiner Arbeit vorliegenden Resultate der Literatur(Seite 2) ließen vermuten, daß man mit der in dieser Arbeit angewandten Methode auf einfachere als bisher beschriebene Weise zur Darstellung der freien Steroidglucuronsäuren kommen würde. Das ist zwar nicht ganz erreicht. Immerhin gelang es, Salze einiger Steroidglucuronsäuren zu gewinnen. Aus ihnen kann die freie Säure -wenn auch nicht analysenrein- papier- und dünnschichtchromatographisch rein gewonnen werden. Im Verlauf meiner Arbeit erschienen einige Veröffentlichungen über die Reindarstellung von Steroidglucuroniden. Besonders ist die Arbeit von W o t i z, S m a k u l a, L i c h t i n und L e f t i n[13] zu nennen, die über die Darstellung von Glucuronidestertetraacetaten und in wenigen Fällen über die Reindarstellung der freien Säuren berichteten. Ferner ist die Arbeit von P e l z e r[39] erwähnenswert, der die Synthese der Dehydro-epi-androsterongluc uronsäure in 46proz. Ausbeute mitteilt. Der von ihm gefundene Schmelzpunkt (17o-21o°C) weicht von dem der Produkte von W o t i z[13] (23o-232°C) und S h a p i r o[1o] (262-264°C) erheblich ab. S t a i b[4o] veröffentlichte eine Synthese der Androsterongluc uronsäure durch Schütteln von Androsteron mit Triacetyl-brom-glucuronsäureester bei Gegenwart von Silberoxyd und anschließendem Desacetylieren und Verseifen in alkalischem Methanol. Die von ihm gewonnene freie Säure wird aus Methanol-Äther umkristallisiert. Es fehlen aber Angaben der CH-Bestimmungen und des Drehwertes. Nach den Erfahrungen, die ich einerseits mit der Androsterongluc uronsäure, andererseits mit dem Natriumsalz gemacht haben, ist anzunehmen, daß das vorliegende Produkt

das Natriumsalz ist. Denn nur das Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure läßt sich mit Äther aus Methanol fällen. Die freie Säure ist lediglich durch Zusatz von Wasser aus Methanol umzufällen.

Aus diesen unterschiedlichen Ergebnissen geht schon hervor, wie schwierig die Bearbeitung der Steroidglucuronide trotz der vielen Veröffentlichungen heutzutage noch ist.

Wenn auch die Ausbeuten unserer Glucuronsäuren - bedingt durch die Nebenprodukte- etwas niedriger als die in der Literatur angegebenen ausfallen, so konnte doch gezeigt werden, daß die katalytische Oxydation der Steroidglucoside zu den Steroidglucuronsäuren stattfindet. Damit ist auch die Möglichkeit gegeben, die Synthese der Steroidglucuronsäuren auf zwei verschiedenen Wegen durchzuführen. Welcher Weg nun eingeschlagen wird, muß sich nach dem gewünschten Glucuronid richten. Nicht zu empfehlen ist die katalytische Oxydation in den Fällen, in den das Aglykon ein oder mehrere konjugierte Systeme aufweist. Dagegen wird die katalytische Oxydation in den Fällen den Vorzug haben, in denen die Entacetylierung und Verseifung versagt.

V. Zusammenfassung

Die Glucoside von Cholesterin, Androsteron und Dehydro-epi-androsteron werden im bicarbonatalkalischen, wäßrigen Medium bei Gegenwart von Platin oder Platinkohle der katalytischen Oxydation unterworfen. Dabei tritt eine Oxydation zur Glucuronsäure des betreffenden Steroids ein. Aus dem in 5oproz. Ausbeute anfallenden Rohprodukt gelingt es, die Säure in Form ihrer Salze zu isolieren.

So konnte ich das Cinchoninsalz der Cholesterin-glucuronsäure gewinnen. Bei der Oxydation zur Androsteron-glucuronsäure wird neben dem Natrium- und Cinchoninsalz ein Produkt SIII isoliert. Die Dehydro-epi-androsteron-glucuronsäure wird ebenfalls als Natriumsalz charakterisiert. Aus den Natriumsalzen lassen sich die freien Säuren gewinnen.

Ergosterin-ß-glucosid wird bei den Reaktionsbedingungen auch am konjugierten System angegriffen.

Zur Identifizierung der Steroidglucoside und deren Oxydationsprodukte und zur qualitativen Trennung von Glucose und Glucuronsäurelacton werden neue Lösungsmittelsysteme für die Papier- und Dünnschichtchromatographie verwendet.

VI. Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen:

Analysen: Die Mikroanalysen wurden von Dr. A. Schoeller, Kronach/Ofr. durchgeführt.

Spez.Drehung: Zur Messung der optischen Drehung diente das Polarimeter o,o1 von Zeiss-Winkel.

Schmelzpunkte: Die Schmelzpunkte wurden auf einem Mikroskop-Heiztisch nach Weygand bestimmt.

Spektren: Die IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer Spektrometer Modell 21 aufgenommen. (Die Aufnahmen besorgte Herr Rose im Institut für organische Chemie der Universität).

Die UV-Messungen für die Analysen nach F i s h m a n machte ich mit dem Beckman-Spektrometer Modell DU.

Chromatographie:

Für die Papierchromatographie wird Schleicher-Schüll-Papier Nr. 2o43b benutzt. Die angewandten Systeme haben folgende Zusammensetzung:

Systeme nach B u s h[26]:

BI a: n-Butanol-2n NH_3

BIIa: Toluol-t-Butanol-Eisessig-Wasser (75-25-3o-7o)

Eigene Systeme:

W I: Wasser-Methyglycol-Pyridin-Cyclohexan-Benzol(1-4-4-1o-2)

WII: Wasser-Methylglycol-Pyridin-Cyclohexan-Pentanol(1-4-4-11-1)

WIII: Butanol-Toluol-2n NH_3(4-1-5)
(2 Teile 12,8n NH_3+1o,84 Teile Wasser)

WIV: Butanol-Toluol-1,3n NH_3(4-1-5)
(1 Teil 12,8n NH_3+9 Teile Wasser)

Laufmittel ist stets die organische Phase.
Lutidin: 2,4-Lutidin und Wasser werden im gleichen Verhältnis miteinander vermischt und als Laufmittel die organische Phase verwendet.-Zum Nachweis der Cholesterin- und Ergosterinderivate dient eine 3oproz. chloroformische $SbCl_3$-Lösung. Die 17-Ketosteroide werden auf dem Papierchromatogramm mit dem Z i m m e r m a n n - Reagens[33] identifiziert. Die Papiere werden dazu zunächst mit einer 2n methanolischen KOH-Lösung und dann mit 2proz. methanolischer m-Dinitrobenzollösung eingesprüht und 2 min in der Hitze getrocknet.

Zum Nachweis der Glucuronsäuren dient o,2proz. äthanolische Naphthoresorcinlösung, die mit 1o Vol% 8o proz. Orthophosphorsäure versetzt ist. Das eingesprühte Papier wird 1o min im Trockenschrank bei 1oo° getrocknet.

Die Zuckerchromatogramme werden nach T r e v e l y a n[32] behandelt. o,1 ml gesättigte $AgNO_3$-Lösung werden mit 2oml Aceton versetzt, die auftretende Trübung durch Zusatz von o,5 ml Wasser entfernt. Nachdem das Papierchromatogramm mit dieser Lösung eingesprüht ist, wird es mit einer o,5n methanolischen KOH-Lösung behandelt. Durch Eintauchen in 2n NH_3 wird überschüssiges Ag_2O entfernt.

Für die quantitative Chromatographie benutzte ich Whatman-Cellulose Powder"standard grade" und Cellulosepulver von Schleicher + Schüll.

Für die Dünnschichtchromatographie werden Glasplatten (5x14cm) mit einem Brei von o,8g Kieselgel G (Merck) und 2,5 ml Wasser gleichmäßig bestrichen und 1/2 Std bei 13o° getrocknet. Sie sind dann gebrauchsfertig. Die Identifizierung erfolgt mit Chlorsulfonsäure in Eisessig (1:2) oder zum Nachweis der

Glucuronsäuren mit der Naphthoresorcin-Lösung. Das Zimmermann-Reagens ergibt zwar auch eine sichtbare Farbreaktion, sie ist aber wesentlich schwächer als die Anfärbung mit Chlorsulfonsäure.

Treten mehrere Flecken in einem Chromatogramm auf, so wird durch Unterstreichen oder Einklammern der R_F-Werte der Anteil der einzelnen Substanzen wiedergegeben. Es bedeuten: sehr starke, starke, normale, (schwache) und ((sehr schwache)) Intensität.

Als Abkürzungen benutze ich Fp=Schmelzpunkt; PC=Papierchromatogramm; DC=Dünnschichtchromatogramm.

Pentaacetylglucose[41]

Die als Ausgangsmaterial verwendete Pentaacetylglucose wird nach G a t t e r m a n n - W i e l a n d aus 5o g wasserfreier Glucose, 25o ml Ac_2O und 25 g Natriumacetat dargestellt. Beim Erwärmen auf 6o-7o° tritt die Reaktion ein. Noch 4 weitere Stunden erhitzt man die Lösung im Wasserbad und gießt sie danach unter kräftigem Rühren in Eiswasser. Die ausgefällte Pentaacetylglucose läßt man einige Stunden unter Eiswasser stehen, saugt sie dann ab, wäscht mehrmals mit Wasser und kristallisiert das Rohprodukt aus Äthanol um, Ausbeute 71,5 g = 71,5% der Theorie. Der Schmelzpunkt beträgt 128-129°C.

α-Acetobromglucose[41,42]

Getrockneten Bromwasserstoff, der aus 3o ml Brom und 5o ml Tetralin dargestellt wird[43], leitet man in 5o ml Eisessig ein. 28 g Pentaacetylglucose werden unter Eiskühlung mit der HBr-Lösung übergossen und durch Schütteln in Lösung gebracht. 5 Stunden läßt man die Reaktionslösung stehen und engt sie dann

im Vacuum bei 5o-6o° bis zur Trockne ein. Den Rückstand nimmt man in der Wärme mit 8o ml Äther auf und läßt die Lösung im Eisschrank abkühlen. Es kristallisieren 21,6 g α-Acetobromglucose vom Fp = 83-86°C aus. Die Ausbeute beträgt, auf Pentaacetylglucose bezogen, 74% d.Th., bzw. 54% d.Th. über alles. Die Acetobromglucose muß frisch verarbeitet werden.

Silbercarbonat

Unter kräftigem Rühren läßt man in eine Lösung von 12,o75 g Na_2CO_3 in 15oo ml Wasser eine $AgNO_3$-Lösung, 4o,811 g in 15oo ml Wasser, einfließen; das ausgefällte Silbercarbonat wird mehrmals mit Wasser, dann mit Aceton und Äther gewaschen und im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet. Die Auswaage beträgt 25 g = 75,5% d. Th.

Der Katalysator

a: Platin. PtO_2(82%) wird in einem Kolben in 2o ml Wasser suspendiert. Ein kräftiger N_2-Strom verdrängt den gelösten und überstehenden Wasserstoff. Anschließend leitet man Wasserstoff ein und entfernt ihn darauf erneut mit N_2. Der so hergestellte Platinkatalysator wird in wäßriger Suspension zur Oxydationslösung gegeben.

b: Platinkohle. Die verwendete Trägerkohle muß von den letzten Spuren Eisen befreit werden[45]. Dazu rührt man Carboraffin mit halbkonzentrierter Salzsäure kräftig durch und läßt die Suspension 24 Std. stehen. Die Kohle wird abfiltriert und mit destilliertem Wasser chloridfrei gewaschen. Das Auswaschen nimmt einige Zeit in Anspruch. Die Kohle wird nun im Vakuum bei 1oo° getrocknet. Zur Darstellung des eigentlichen Platinkataly-

sators werden 14o mg H_2PtCl_6 in 6 ml Wasser gelöst, mit 5oo mg hochgereinigter Kohle unter kräftigem Rühren versetzt und erneut 1o - 2o ml Wasser zugegeben. Dann fügt man 45 mg $NaHCO_3$ zu und tropft bei 8o° aus der Mikrobürette o,3 ml Formaldehyd in die Suspension, die mit $NaHCO_3$ auf einem pH von 8 gehalten wird. Die Platinkohle wird einige Zeit bei 8o°C gerührt, abgesaugt, mit konzentrierter NaCl-Lösung und anschließend mit 3mal 2o ml Wasser gewaschen.

Reinigung des Cholesterins

Das aus rohem Cholesterin mit Brom in Eisessig erhaltene Dibromid (78% d.Th.) wird nach F i e s e r [24] mit frisch aktiviertem Zinkstaub entbromiert. Man erhält so das gereinigte Cholesterin, Fp von 148-149°C, in 73proz. Ausbeute.

Cholesterin-ß-glucosid

3,o63 g Cholesterin werden in 1oo ml Benzol auf dem Wasserbad bei 87° erhitzt. Man setzt 3,o41 g Silbercarbonat zu und tropft in das siedende Benzol unter kräftigem Rühren langsam eine Lösung von 5,49 g α-Acetobromglucose in 15o ml Benzol ein. Im gleichen Maße wird auch Benzol abdestilliert, um das Wasser aus der Reaktionslösung azeotrop zu entfernen. Nach 1 1/2 Std. ist die Umsetzung beendet. Die benzolische Lösung wird abgekühlt, vom Silbersalz durch Filtration befreit und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in 5o ml Äthanol aufgenommen. Nachdem man die Lösung abgekühlt hat, kristallisieren 3,24 g Glucosidtetraacetat des Cholesterins(= 58,6% d.Th.) aus. Da der Schmelzpunkt 112°beträgt, wird nochmals aus Äthanol umkristallisiert. Die Ausbeute beträgt nun 2.o17 g = 36% d.Th., der Fp = 134-136°.

548 mg Tetraacetat werden in 5o ml heißem Äthanol gelöst und mit 1o ml frisch bereitetem 2n $NaOCH_3$ versetzt. Das ausgefallene Glucosid wird abfiltriert, mit heißem Wasser und Alkohol gewaschen, in Pyridin kurz aufgekocht und die Lösung filtriert. Man setzt Wasser zu, bis die Lösung trübe wird. Das Glykosid kristallisiert langsam aus. Es wird nach dem Absaugen mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Auswaage beträgt 215 mg Cholesteringlucosid = 5o% d.Th. bezogen auf eingesetztes Tetraacetat. Der Schmelzpunkt liegt bei 275-285°. Der Drehwert wird in Pyridin aufgenommen: $[\alpha]_D^{17} = -48,8° \pm 5°$, $M_D = -267°$. Nach K l y n e[44] kann man angenähert berechnen, ob ein α- oder ein ß-Derivat vorliegt:

Cholesterin $[\alpha]_D^{2o} = -31,59$; $M_D = -122°$ (Äther) gef.

α-Methylglucosid $[\alpha]_D^{2o} = +16o,8°$; $M_D = +312°$ (Äthanol) gef.

ß-Methylglucosid $[\alpha]_D^{2o} = -32,8°$; $M_D = -63,6°$ (Äthanol) gef.

Cholesterin-α-glucosid $M_D = +184,5°$ ber.

Cholesterin-ß-glucosid $M_D = -185,6°$ ber.

Nach dem gefundenen M_D-Wert haben wir ein ß-Glucosid vorliegen.

Chromatographie des Cholesterin-ß-glucosids

Untersucht man Cholesteringlucosid im Papierchromatogramm mit den üblichen Kaisergemischen[45], Heptan-Butanon, Xylol-Butanon und Benzol-Butanon, so hat man keinen Erfolg. Im Gemisch i-Oktanol, Pentanol, Wasser, Eisessig (6-2-1-4) wandert das Glykosid nur mit einem sehr kurzem R_F-Wert, ebenso in Chloroform-Benzol. In der organischen Phase des Systems Wasser-Methylglykol-Pyridin-Chloroform(2-4-4-12) läuft das Glucosid mit der Front. Ersetzt man das Chloroform durch Benzol, so erhält man das gleiche Ergebnis. Eine Veränderung tritt ein, wenn ich statt Chloroform Cyclohexan einsetze. Das Glucosid

wandert dann nicht, sondern bleibt am Start hängen. Werden die beiden letzten Gemische im Verhältnis 5:1 zusammengegeben, so erhalten wir das System WI, das die Zusammensetzung Wasser-Methylglycol-Pyridin-Benzol-Cyclohexan im Verhältnis 1:4:4:2:1o aufweist. Mit der wäßrigen Phase wird das Papier imprägniert. In der organischen Phase läßt man das Cholesteringlucosid laufen, das mit $SbCl_3$ unter der UV-Lampe beim R_F = o,25 nachzuweisen ist. Cholesterin läuft in diesem Gemisch mit der Front.

Ergosterin-ß-glucosid

3,533 g gereinigtes Ergosterin löst man in 1oo ml siedendem Benzol, gibt 4 g Silbercarbonat zu und läßt unter kräftigem Rühren 5,9o9 g Acetobromglucose, in 15o ml Benzol gelöst, im Verlauf von 1 1/2 Stunden zulaufen. In der gleichen Zeit destillieren 154 ml Benzol ab. Die Lösung wird abgekühlt, filtriert, der Silbersalzrückstand mit Benzol nachgewaschen und die Filtrate eingeengt. Der Rückstand wird aus 65 ml Äthanol umkristallisiert. Dabei fällt 2,388 g Tetraacetat des Ergosterin-ß-glucosids-36% der Theorie-mit einem Fp. von 165°C an.

2,o87 g Tetraacetat werden in 7o ml Alkohol aufgelöst und der Verseifung mit 2n $NaOCH_3$ unterworfen. Das ausgefallene Glucosid wird mit Wasser gewaschen, mit Pyridin versetzt und die Pyridinlösung heiß filtriert. Daraus kristallisiert durch Zusatz von Wasser das Ergosterin-ß-glucosid in Nadeln aus. Das Glucosid wird mit Alkohol und Äther gewaschen und liefert nach Trocknen im Hochvakuum 735 mg Ergosterin-glucosid=46% der Theorie. Der Fp. beträgt 293-297°, der Drehwert $[\alpha]_D^{2o}$= - 1o1,5±8°, M_D = -594(Pyridin). Die Berechnung nach K l y n e ergibt für die theoretische molekulare Drehung folgende Werte:

Ergosterin $[\alpha]_D^{20} = -132^o$, $M_D = -522^o$ (Chloroform) gef.
Ergosterin-α-glucosid $M_D = -210^o$ ber.
Ergosterin-ß-glucosid $M_D = -585{,}6^o$ ber.

Der gefundene M_D-Wert stimmt mit dem M_D-Wert für das ß-Derivat sehr gut überein.

Chromatographie des Ergosterin-ß-glucosids

Die Chromatographiegemische nach B u s h[26] waren für die Identifizierung des Ergosterin-ß-glucosids nicht geeignet. In dem Gemisch Butanol-2n NH_3 (BIa) läuft das Glykosid mit der Front. Auch Gemische von BIa mit anderen Lösungsmitteln, in denen das Glucosid langsamer läuft, ergeben kein einwandfreies Chromatogramm. Im Gemisch WI wandert das Glucosid bis zu einem R_F von o,57. Den gleichen R_F-Wert zeigt aber auch das Tetraacetat. In dem System Wasser-Pyridin-Methylglykol-Cyclohexan-Pentanol (1-4-4-1o-2) erreicht man keine Trennung der Substanzen. Sie bleiben am Start, wenn man Pyridin durch den gleichen Anteil Eisessig ersetzt. Beide Produkte laufen mit der Front, wenn man statt des Cyclohexans Toluol, Xylol oder Butanol verwendet. Lediglich in zwei Gemischen der Zusammensetzung Wasser-Methylglykol-Eisessig-Cyclohexan-Butanol (2-4-4-1o-2) bzw. (3-4-4-6-6) läuft das Glykosid mit den R_F-Werten o,35 bzw. o,57. Gute Trenneffekte erhält man jedoch mit dem System Wasser-Methylglykol-Pyridin-Cyclohexan-Pentanol(1-4-4-11-1) (WII). Das Ergosterin läuft in WII mit einem R_F o,12, das Tetraacetat mit o,97 und das Ergosterin mit der Front.

Androsteron-ß-glucosid

2,o23 g Androsteron[+] löst man in 15o ml Benzol, gibt in

[+] Fa. NV-Organon-Oss, Holland.

die siedende Lösung 7,5 g Silbercarbonat und läßt im Verlauf von 2 Std. 8,8 g α-Acetobromglucose, in 2oo ml Benzol gelöst, zutropfen. Während dieser Zeit werden entsprechend 2oo ml Benzol abdestilliert. Nachdem ich die Lösung filtriert habe, wird sie im Vakuum zum Syrup eingeengt. Man nimmt den Rückstand mit wenig Alkohol auf, erwärmt etwas die Lösung und setzt Benzol zu. Beim Abkühlen kristallisieren 2,123 g Androsteronglucosidtetraacetat in feinen Nadeln aus. Die Ausbeute beträgt 5o% d.Th., der Fp 192°C.

Aus einem anderen Glykosidierungsansatz wird das Tetraacetat gar nicht erst isoliert. 3,768 g Androsteron+) werden bei 85°C in 2oo ml Benzol mit 1o g Silbercarbonat versetzt. Im Verlauf von 3 1/4 Std. tropft man eine Lösung von 18 g α-Acetobromglucose in 3oo ml Benzol zu. Der Reaktionsansatz wird filtriert, eingeengt und mit 2oo ml absolutem Methanol aufgenommen. Nach Zusatz von 2 ml $NaOCH_3$ läßt man die Reaktionslösung einige Stunden stehen. Man neutralisiert mit 15proz. Essigsäure, engt die Lösung ein, setzt Wasser zu und dampft wiederum vorsichtig im Vakuum ein. Dabei fällt das rohe Glucosid aus, das nach Trocknen im Vakuum in Aceton aufgenommen und durch Zusatz von Äther auskristallisiert wird. Man kristallisiert es nochmals aus Aceton/Äther um und erhält so 2,o91 g Androsteronglucosid = 35,6% d.Th. Es zeigt einen Doppelschmelzpunkt bei 124° und bei 217 - 225°. Der Drehwert wird in Chloroform aufgenommen, er beträgt $[\alpha]_D^{2o} = +35,4° \pm 5°$, M_D = = +16o°: Nach Klyne erhält man folgende Werte:

+) Fa. Siemsgliess + Sons.

Androsteron $[\alpha]_D$ = + 394,5°, M_D = + 264,5° gef.
Androsteron-α-glucosid M_D = + 576,5° ber.
Androsteron-ß-glucosid M_D = + 2oo,9° ber.
Wir haben auch hier ein ß-Glykosid vorliegen.

Chromatographie des Androsteronglucosids

Im Gemisch WII laufen die Derivate des Androsterons mit folgenden R_F-Werten: Androsteron o,75, Tetraacetat des Glucosids o,4 und Glucosid o,o5. Das Androsteronglucosid zeigt in dem von B u s h angegebenen Gemischen den R_F-Wert o,93 (BIa) und o,29 (BIIa), in der Dünnschichtchromatographie nach S t a h l[27] mit verschiedenen Lösungsmitteln folgende R_F-Werte:

	Androsteron	Androsteron-ß-glucosid
i-Propyläther	o,48	o,o
Aceton	1,o	o,8
Aceton-Methanol	1,o	o,59
dito 1 : 3	1,o	o,31
Chloroform	-	o,o
Chloroform-Aceton	o,9	o,36

Dehydro-epi-androsteron-ß-glucosid

2,773 g Dehydro-epi-androsteron[+] (Fp 147,5-148°C) werden in 2oo ml Benzol gelöst und im Verlauf von 4 3/4 Stunden mit 1o g Silbercarbonat und 6 g α-Acetobromglucose in 2oo ml Benzol versetzt. Während der Reaktion destilliert man langsam Benzol ab und gibt dann die Lösung noch warm über ein Blaubandfilter. Das Silbersalz wird mit Benzol gründlich nachgewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum bei 5o°C eingeengt. Dann wird das

[+] Fa. NV-Organon-Oss, Holland

Produkt in Äthanol aufgenommen und eine Verseifung mit n Na_2CO_3-Lösung in der Kälte versucht. Aus dem ausgefällten und abfiltrierten Produkt gewinnt man durch Umkristallisieren aus Äthanol 1,972 g Kristalle mit dem Fp. 175-177°. Zunächst hielt ich das isolierte Produkt für das gewünschte Glucosid. Diese Annahme konnte aber durch verschiedene Untersuchungen nicht bestätigt werden. Nach nochmaligem Umkristallisieren zeigt das isolierte Produkt einen Fp. von 181°. Bei den papierchromatographischen Untersuchungen laufen Ausgangsmaterial und diese Verbindung im System WII gleich, im System BIIa und auf der Dünnschichtplatte mit verschiedenen R_F-Werten. Um festzustellen, ob das Ausgangsmaterial und die Kristalle verschiedene Produkte sind, wird ferner die Anthronreaktion auf Glykoside gemacht. Dehydro-epi-androsteron ergibt eine rote Färbung, das Produkt (Fp.172°) dagegen die typisch grüne Farbe der Glykoside. Der Acetatnachweis mit Hydroxamsäure verlief positiv, ein Beweis dafür, daß die vorliegende Verbindung das Tetraacetat des Dehydro-epi-androsteronglucosids ist. Die Ausbeute an Tetraacetat, einschließlich dem aus der Mutterlauge durch Chromatographie isolierten Tetraacetats, beträgt 35%, der Fp.= 181° und der Drehwert $[\alpha]_D^{20} = + 7,5 \pm 2,5°$(Methanol). Die Verseifung gelingt besser auf folgendem Wege: o,993 g Tetraacetat werden in 35 ml Äthanol auf dem Wasserbad bei 7o° erwärmt und durch langsames Zufließen von 4 ml 2n methanolischer KOH verseift. Nachdem die Reaktion beendet ist, setzt man 2o ml Wasser zu, dann 1o ml Äthanol und erneut 2o ml Wasser. Beim langsamen Einengen fällt das Glucosid kristallin aus. Die Rohausbeute beträgt 73o mg = 99,5% der Theorie. Nach Umkristallisieren aus Äthanol erhält man 662 mg Glucosid vom Fp. 225 -226,5°(=91,5% der Theorie).

Der

Drehwert zeigt in Methanol: $[\alpha]_D^{20} = -5,95 \pm 0,5^\circ$, $M_D = -26,8$. Nach K l y n e erhält man folgende M_D-Werte:

Dehydro-epi-androsteron $\alpha_D^{20} = +11^\circ$, $M_D = +31,7^\circ$ (Alkohol) gef.

Dehydro-epi-androsteron-α-glucosid $M_D = +343,7^\circ$ ber.

Dehydro-epi-androsteron-ß-glucosid $M_D = -36^\circ$ ber.

Der Vergleich dieser Werte mit dem von uns gefundenem spricht wiederum für ein ß-Glucosid.

Chromatographie der Dehydro-epi-androsteron-Derivate

Im Gemisch WII laufen Aglykon und Glucosidtetraacetat mit den gleichen R_F-Werten von o,5, im Gemisch BIIa dagegen mit den Werten o,42 und o,21. Das chromatographische Verhalten des Dehydro-epi-androsterons, des Glucosid-tetra-acetates und des Glucosids auf Kieselgel- und Al_2O_3-Dünnschichtplatten geht aus folgender Tabelle hervor. Die Chromatographie auf Al_2O_3-Platten erfolgt mit 2 Lösungsmittelsystemen. Nachdem das 1. Gemisch wie üblich fast bis zum oberen Rand der Dünnschichtplatte gelaufen ist, wird das Chromatogramm getrocknet und in das Gefäß mit dem 2. Lösungssystem gestellt. Die 2. Lösungsmittelfront läßt man bis zu einem R_F von o,5 wandern. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf die Front des 1. Gemisches.

	Dehydro-epi-androsteron	Tetra-acetat	Glucosid
Kieselgel G:			
i-Propyläther	o,44	o,24	o,o
$CHCl_3$-Aceton	1,o	o,9	o,27
Al_2O_3 G:			
1. Aceton-i-Propyläther	o,75	o,53	o,o
2. Essigester	o,65	o,54	o,o
2. Pyridin(2% H_2O)	o,62	o,52	o,41
2. Pyridin-Wasser (9:1)	o,62	o,53	o,37

Auf Grund dieser Tatsachen kann an 19 g Al_2O_3(49oo) rohes Tetraacetat, das der Verseifung unterlag, in die einzelnen Komponenten aufgeteilt werden. Die Größe der einzelnen Fraktionen beträgt 4o ml. Zunächst werden 32o ml Aceton-Di-i-propyläther (1:9) über die Säule gegeben, dann 8o ml Aceton und zum Schluß 8o ml wasserhaltiges Pyridin. Aus den eingesetzten 956 mg kann man 15o mg Dehydro-epi-androsteron, 519 mg Tetraacetat und 233 mg Glucosid isolieren.

Oxydation von Cholesterin-ß-glucosid

98 mg Cholesteringlucosid werden im Dreihalskolben in 15o ml bidestilliertes Wasser gegeben, 5 ml o,5n $NaHCO_3$-Lösung und zunächst Platinkatalysator (=17 mg PtO_2) zugesetzt. Dann leitet man bei einer Temperatur von 9o° O_2 in die Lösung ein und läßt unter kräftigem Rühren das Glucosid 8 Std. reagieren. Von Zeit zu Zeit wird neuer Katalysator zugegeben (insgesamt = 4o mg PtO_2). Die Oxydationslösung wird nach beendeter Reaktion filtriert und im Vakuum auf 65 ml eingeengt. Man säuert die Lösung mit 28 ml $\frac{n}{1o}$ HCl und extrahiert das ausgefallene Oxydationsprodukt mit methanolhaltigem Chloroform. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und ergibt nach Einengen im Vakuum 44,5 mg Rückstand. Mit Äthanol wird er in der Hitze aufgenommen und die Lösung dann vorsichtig eingeengt. Dabei fällt das Oxydationsprodukt nur in Flocken aus. Nach Absaugen und Trocknen zeigt es einen Fp von 272-74° und ergibt nach L i e b e r m a n n - B u r c h a r d mit Chloroform, Schwefelsäure und Essigsäure-anhydrid eine rote Färbung, die dann langsam in Blau übergeht. Das Produkt reagiert ebenfalls mit Naphthoresorcin positiv. Im Gemisch WI hat es einen R_F-Wert von o,1. Zur Darstellung eines kristallinen Derivates werden 35 mg Oxy-

dationsprodukt in 8 ml Äthanol aufgelöst und dazu 15 mg N,N'-Dibenzyläthylendiamin gegeben. Man läßt 2h unter Rückfluß reagieren, filtriert die abgekühlte Lösung und engt sie vorsichtig ein. Der Rückstand wird mit wenig Methanol aufgenommen und Ester und Petroläther zugesetzt. Dabei kristallisieren wenig feinkristalline Nadeln aus, die eine positive L i e b e r m a n n - B u r c h a r d - Reaktion ergeben. Der Schmelzpunkt beträgt 132°. Nach mehrmaligen Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther und anschließendem Waschen mit Äther ist er auf 242-243° gestiegen.

Cinchoninsalz der Cholesterin-glucuronsäure

Aus einem zweiten Oxydationsansatz, in dem 124 mg Glykosid umgesetzt wurden, isoliert man das Oxydationsprodukt als Cinchoninsalz. Der durch Ansäuern mit 5 ml HCl auftretende Niederschlag (ca. 5o mg) wird in 4o ml Äthanol aufgenommen und 2o ml der Lösung mit 17 mg Cinchonin unter Rückfluß 2 Std. erhitzt. Vom überschüssigen Cinchonin wird abfiltriert, die Lösung mit 5 ml Aceton-Wasser versetzt, kurz aufgewärmt und langsam im Wasserbad abgekühlt. Dabei kristallisiert das Salz in Nadeln aus. Es wird abgesaugt und die Kristalle mit Aceton und Äther gewaschen. Man erhält 27 mg Kristalle (= 64% Ausbeute) mit einem Schmelzpunkt von 235-47°C. Die L i e b e r m a n n -Reaktion und der Test mit Naphthoresorcin verlaufen positiv. Nach mehrmaligen Umkristallisieren aus Äthanol-wäßrigem Aceton und Waschen mit Aceton und Äther erhält man 8 mg Cinchoninsalz der Cholesteringlucuronsäure. Das Salz zeigt im Gemisch WI einen R_F-Wert von o,42(PC), der Schmelzpunkt beträgt 237-42°.

Oxydation von Ergosterin-ß-glucosid

448 mg Ergosteringlucosid werden in 69o ml Wasser gegeben, mit 2o ml o,5n $NaHCO_3$ und Platinkatalysator (=119 mg PtO_2) versetzt, Bei 6o-7o°C strömt durch eine Kapillare Sauerstoff in die kräftig gerührte Mischung ein. Im Laufe der Reaktion, die 28 Std. dauert, setzt man etwas Katalysator zu. Durch potentiometrische Titration wird ein Absinken des pH-Wertes festgestellt. Danach sind zum Abfangen der Säure 17,86 mg $NaHCO_3$ verbraucht worden. Das entspricht einem Umsatz von 12o mg Glucosid = 27%. Nachdem die Lösung vom Katalysator befreit ist, wird sie im Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Man nimmt den Rückstand mit 3o ml Wasser auf und zentrifugiert vom Ungelösten ab. Das Papierchromatogramm des Rückstandes zeigt im Gemisch WII 4 Flecke mit den R_F-Werten bei o,o72;o,12;o,18;o,23(Glucosid o,12). Das Filtrat versucht man durch Zusatz von Bleiacetat über das Bleisalz zu reinigen. Nach Ausfällen der Pb^{++}-Ionen mit H_2S findet sich in dem Filtrat ein Produkt, das zwar mit Naphthoresorcin positiv reagiert, aber im Papierchromatogramm(WII) wiederum eine Unzahl Flecke aufweist: o,o4;o,18;o,67;o,82;(Glucosid o,17). Die methanolische Lösung des Filtrates wird in der Hitze mit Cinchonin versetzt, überschüssiges Cinchonin abfiltriert und das Filtrat eingeengt. Der Rückstand wird mit wenig Methanol aufgenommen und aus Methanol-Aceton-Wasser umkristallisiert. Das so erhaltene Salz hat einen Fp von 174-185°C, ergibt eine positive L i e b e r m a n n - Reaktion und eine positive Naphthoresorcinprobe. Nach dem Papierchromatogramm ist es aber ein uneinheitliches Produkt mit den R_F-Werten o,16;o,25;o,4 und o,87.

Das Filtrat des Cinchoninsalzes weist Substanzen mit folgenden R_F-Werten auf: o,o4;o,4;o,67;o,82 und o,89.

Oxydation von Androsteron-ß-glucosid

1. Oxydationsansatz: In einem 2 Liter-Dreihalskolben werden 837 mg Androsteronglucosid in 15oo ml bidestilliertem Wasser in der Wärme gelöst. Die Lösung wird im Wasserbad auf 8o° gebracht, mit 2,34 g $NaHCO_3$ auf einen pH von 8,4 eingestellt und im Verlauf der Reaktion mit 8oo mg Platinkohle versetzt. Durch eine Kapillare leitet man in die kräftig gerührte Reaktionslösung Sauerstoff ein. Nach einem Tag zeigt eine Probe des Oxydationsansatzes auf der Dünnschichtplatte ($CHCl_3$-Aceton) noch sehr viel Ausgangsmaterial (R_F=o,25) und wenig Oxydationsprodukt(R_F= o,o). Am 2. Tag liegt umgesetztes Glykosid ungefähr zu einem Drittel vor, daneben tritt aber schon Androsteron (R_F=o,9) auf. Nach 1oo Std. überwiegt der Anteil des Oxydationsproduktes. Das Dünnschichtchromatogramm der Lösung zeigt folgende R_F-Werte:o,o;(o,2;o,33;o,44;o,7;o,93). Nach beendeter Reaktion wird das Produkt warm über ein Blaubandfilter gegeben und die Lösung im Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Man nimmt den Rückstand in 1oo ml Wasser auf und schüttelt die wäßrige Phase mit 15o ml Essigester aus. Das Dünnschichtchromatogramm der Esterphase (Auswaage 9 mg) zeigt folgende R_F-Werte: o,o (o,o75);((o,11));(o,23;o,28;o,33)((o,4;o,52)) und o,8. Die wäßrige Phase wird mit Eis gekühlt, mit 3o ml eiskalter nHCl versetzt und das ausgefallene Oxydationsprodukt mit 7oo ml Essigester ausgeschüttelt. Die Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Man erhält den Rückstand, 418 mg(=5o%)rohes Oxydationsprodukt, als Schaum. Nachdem man

über P_2O_5 getrocknet hat, ergibt die Auswaage 39o mg Substanz, deren DC folgende R_F-Werte zeigt: o,o,((o,14;o,34;o,68)),o,8. Der Rückstand wird mit 1o ml 2n Na_2CO_3-Lösung aufgenommen, wiederum ausgeestert und mit Eis gekühlt. Man setzt 22 ml n HCl zu und schüttelt mit 3oo ml Ester aus. Die Auswaage des Oxydationsprodukts beträgt 312 mg, der R_F-Wert liegt am Start. Die Esterlösung (=11mg) hat die R_F-Werte(o,o) und o,89.

Die wäßrige Lösung der Esterausschüttelung wird mit Butanol extrahiert. Die organische Phase wird eingeengt und mit $AgNO_3$ untersucht. Der Nachweis verläuft positiv und im Papierchromatogramm (Lutidin) treten starke Flecken bei den R_F-Werten o,67 und o,2 auf, es liegen Glucose und Natriumglucuronat vor. Man kann aber auch mit dem Z i m m e r m a n n - Reagens eine Reaktion erhalten, demnach ist in der wäßrigen Phase auch noch ein Steroidderivat enthalten. Tatsächlich kann man durch Aufnehmen des Butanolrückstandes in Natriumcarbonat, Ansäuern und Ausschütteln 41 mg Substanz isolieren, die nach den Chromatogrammen hauptsächlich aus dem Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure besteht. PC:o,13(Gemisch WIII), DC: o,o,(o,1; o,58;o,75),((o,9)).

Der in Wasser suspendierte Katalysator wird nach beendeter Reaktion mit Butanol mehrmals extrahiert. Die organische Lösung wird nach Einengen im Vakuum (=17omg) mit 5 ml 2n Natriumcarbonatlösung aufgenommen und zunächst mit 4o ml Essigester extrahiert. Das Dünnschichtchromatogramm dieser Esterphase zeigt folgende R_F-Werte: o,o;o,o5;o,11;o,16;(o,22;o,3); o,51;o,6;o,73;o,88(Glucosid:o,16). Aus der alkalischen Lösung isoliert man nach Ansäuern und Ausestern 54 mg chromatographisch reines Produkt. DC:Start, PC:o,51.

Silicagel-Chromatographie

Das aus einem 2. Oxydationsansatz, in dem 73o mg Glucosid der Oxydation unterworfen werden, isolierte Oxydationsprodukt wird zur Reinigung an Kieselgel chromatographiert. Nachdem die Reaktionslösung filtriert ist, wird sie eingeengt, in Methanol aufgenommen und die methanolische Lösung auf 3 g Kieselgel aufgezogen. Man gibt das Oxydationsprodukt auf eine Säule, die mit 14o mg Silicagel beschickt ist. Als Lösungsmittel werden verwendet: 11 Chloroform-Aceton, 2,25 l Aceton, 1,5 l Aceton-Methanol(9:1), 1,5 l Aceton-Methanol(4:1), 2,5 l Methanol-Aceton, Methanol und Methanol-Eisessig(1%, 2% und 1o%). Die Fraktionsgröße beträgt ungefähr 25o ml. Aus den beiden ersten Fraktionen erhält man 9o,5 mg Substanz, die im Dünnschichtchromatogramm (Chloroform-Aceton) die R_F-Werte 1,o und o,19, in Di-i-propyläther o,o, o,45, o,79 und o,9 aufweist. Das aus Androsteron mit Bromacetamid in wäßrigem t-Butanol dargestellte Androstan-3,17-dion[46] zeigt im DC in i-Propyläther neben dem Ausgangsmaterial (R_F=o,45) den R_F-Wert von o,79. - In den nächsten 25 Fraktionen fällt das Androsteronglucosid als Hauptprodukt an. Die Auswaage beträgt 3oo mg Glucosid, das zur erneuten Oxydation verwendet wird. Erst wenn dem Aceton Methanol zugesetzt wird, treten die ersten Spuren des Oxydationsproduktes im Chromatogramm auf. 333 mg Substanz gewinnt man aus den Fraktionen 31 - 57, die nach mehrmaligen Aufnehmen des eingeengten Produktes mit Methanol und erneuten Einengen der methanolischen Lösung vom be[illegible]tenden Silicagel abgetrennt wird. Man erhält so 233 mg Produkt mit R_F-Werten von o,o, o,31, und o,9. Die Fraktionen 59-6o, die mit dem Gemisch Methanol-Eisessig (2%) gewonnen werden, liefern nach der üblichen Aufar-

beitung 22,5 mg chromatographisch reine Säure. Aus den vereinigten Fraktionen 31 - 6o erhält man nach erneutem Ansäuern und Ausestern 1oo mg Substanz mit den R_F-Werten o,o,(o,14) im System Chloroform-Aceton(DC).

Analytische Methoden

Zum qualitativen Nachweis der Glucuronsäure werden 5 mg der Fraktion 29 der Silicagelsäure (R_F = o,o) mit 2 ml 6n Schwefelsäure 1 1/4 Std. auf dem Wasserbad bei 95°C erhitzt. 12 Std. läßt man die Hydrolyse stehen, setzt 2 ml Wasser zu und extrahiert das freigesetzte Aglykon mit 3 x 3 ml Äther, gibt wiederum etwas Wasser zu und entfernt bei 5o°C den restlichen Äther. Die saure Lösung wird nun in ein Zentrifugenglas gegeben und mit der äquivalenten Menge Bariumcarbonat bis zu einem PH von 7 versetzt. Das ausgefallenenBariumsulfat wird abzentrifugiert, der Rückstand nochmals an der Zentrifuge gewaschen und die gesammelten Filtrate bei 6o°C im Vakuum eingeengt. Eine Probe wird auf dem Papierchromatogramm in wassergesättigtem 2,4-Lutidin untersucht. Sie zeigt, mit Silbernitrat besprüht, R_F-Werte von o,17 und ((o,69)). Die Vergleichswerte liegen im gleichen Gemisch für Glucose bei dem R_F o,67, für Glucuronsäurelacton bei o,92 und für das Natriumglucuronat bei o,2.

Zum qualitativen Nachweis benutzt man ferner Naphthoresorcin in Äthanol mit einem 1oproz. Zusatz von Phosphorsäure. Das Dünnschichtchromatogramm zeigt bei positiv reagierenden Substanzen blaue Flecke auf rötlichem Hintergrund, während auf dem Papierchromatogramm bei zu langem Erhitzen eine Verkohlung eintritt. Besonders gut eignet sich auch Glasfaserpapier als Trägermaterial. Man erhält aber nur verschwommene Flecke, die durch

die Struktur bedingt sind.

Der quantitative Nachweis auf Glucuronsäuren erfolgt mit Naphthoresorcin im wesentlichen nach F i s h m a n. Wenn es mir nur auf eine laufende Untersuchung der Steroidglucuronsäuren ankommt und kein besonderer Wert auf die Trennung von freier Glucuronsäure und Steroidglucuronid gelegt wird, wird die Methode folgendermaßen abgeändert. Es werden o,1 - o,2 mg Produkt mit 5 ml Wasser versetzt, 2 ml 5o% Schwefelsäure und 2 ml einer o,4% wässrigen Naphthoresorcinlösung zugegeben und die Mischung 1 1/2 - 2 Std. bei 9o° C erhitzt. Dann wird der entstandene Farbstoff mit 1o ml Äthanol und 8 ml Toluol ausgeschüttelt und die organische Phase im UV-Gerät bei 578 mμ mit einer aus Natriumglucuronat entsprechend angesetzten Eichlösung verglichen.

Chromatographie des Oxydationsproduktes

Das isolierte Produkt des 1. Oxydationsansatzes (Seite 47) zeigt im F i s h m a n - T e s t einen Gehalt von nur 3o% Steroidglucuronsäure. Man läßt daher die Substanz auf dem Papierchromatogramm im System WIII laufen. Die Untersuchung ergibt 4 Flecke auf dem Chromatogramm, die mit folgenden Sprühmitteln reagieren:

	R_F	$SbCl_3$	Dinitrobenzol	Naphthoresorcin	$AgNO_3$
1.	o,47	+	+		
2.	o,33		+	+	
3.	o,24	+	+		(+)
4.	o,o4		+	+	((+))

In diesem Chromatogramm sind die Substanzen recht kurz gelaufen, gewöhnlich liegen die Werte bei o,9; o,5 - o,7; o,4 und o,11 - o,2. Die 1. Werte sind dem Androsteronglucosid zuzuordnen.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird der Oxydationsansatz an 25 g Cellulose (Whatman) mit dem System Butanol-Toluol-2n NH_3 (WIII) chromatographiert. Bei einem v_o von 59 ml erhält man 77 Fraktionen, die zu 5 Hauptfraktionen zusammengefaßt sind:

Fraktion	Nr.	Auswaage mg	%	R_F (PC)	Glucuronsäure-gehalt	(Seite)
A	1- 5	14,5	5	o,95		(52)
B	6-29	66	2o	o,51	55%	(51)
C	3o-41	3o	9	(o,44),o,34		(52)
D	42-75	67	2o	(o,32),o,23		(52)
E	76-77	148	46	o,11	48%	(52)

Fraktion B zeigt nach der üblichen Aufarbeitung, d.h. nach Ansäuern und Ausestern, den in der Tab. angegebenen Glucuronsäure-Gehalt. Sie wird deswegen nochmals chromatographiert(6 g Cellulose, v_o = o,95 ml). Man erhält 36 Fraktionen, die wiederum zusammengefaßt werden:

Fraktion	Nr.	Vol. ml	Auswaage mg	%	R_F(PC)	Aufarbeitung (Seite)
B I	1 - 1o	6,6	1	1	o,96	(52)
B II	11- 18	1o,1	1o	15	o,78	(51)
BIII	19- 2o	2,5	3	5	o,7;o,57	(52)
B IV	21- 36	98,5	32	48	o,4	(53)
B V	Metha-nol	1oo	2o	3o	o,2	(52)

Fraktion B II: Nach Freisetzung mit HCl zeigt das Dünnschichtchromatogramm in der leichten Phase von WIV die R_F-Werte o,o7 (o,2;o,27). Die Naphthoresorcinprobe ergibt den Hauptfleck bei o,o8 und einen Nebenfleck am Start. Der Rückstand des mit Ester aufgenommenen Produktes ist das Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure, das aus Methanol-Äther ausgefällt wird. Beim

Behandeln mit Ester treten feine Nadeln auf. Der F i s h - m a n - Test ergibt einen 1oo% Glucuronsäuregehalt. Die R_F-Werte betragen im PC o,33, im DC o,o. Das Filtrat enthält zum großen Teil freie Säure, aber auch noch etwas Natriumsalz. Es wird deswegen nochmals chromatographiert (siehe unter B IV).

Fraktion E und B V: Die Fraktion E ergibt nach dem üblichen Aufarbeiten ein 48proz. Glucuronsäuregehalt. Sie wird mit Fraktion B V zusammengegeben und die vereinigten Fraktionen werden mehrmals mit HCl aus Wasser umgefällt. Das so gewonnene Produkt wird mit Äther und Ester behandelt (DC vom Ester: R_F = o,o6; o,2;o,25;o,32;o,9) und der Rückstand (DC: R_F = o,o) im Gemisch Methanol-Wasser über Ionenaustauscher, Amberlite IRC 5o, gegeben. Das Eluat enthält neben der freien Säure, die mit Ester entfernt wird, unumgesetztes Natriumsalz der Androsterongluc-uronsäure.

Die anderen Fraktionen des 1. Oxydationsansatzes zeigen auf der Dünnschichtplatte folgende R_F-Werte (siehe auch Seite 16):

A:	o,12;o,25;o,37;o,62	System WIV, leichte Phase
C:	o,12;o,26;o,98	"
D:	o,12;o,26;o,98	"
B III:	(o,o),o,1;o,23	
B I:	(o,o9),o,23;o,49;o,94	"

Die Fraktionen A, B I ,B III, C und D und die rohen Oxydationsprodukte, die man aus dem Katalysator und der Mutterlauge des 1. Oxydationsansatzes gewinnt, werden zusammen eingeengt (Auswaage = 19o mg) und an 19 g Silicagel mit der leichten Phase vom Gemisch W IV chromatographiert. Die Fraktionen, deren Volumen jeweils 7,6 ml beträgt, werden zusammengefaßt.

Die wichtigsten Hauptfraktionen sind:

	Auswaage	R_F-Werte	
SII	12 mg	DC: o,o;o,19;o,27;o,54	
SIII	4o mg	(o,o);o,16;o,95	
S IV	56 mg	o,o;o,o8	PC: o,32; o,45 (Seite 55)

S II wird nicht weiter aufgearbeitet

Produkt S III

Fraktion S III wird in 2 ml 2n Natriumcarbonatlösung aufgenommen und mit 2x 1o ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase (Auswaage 4,8 mg) zeigt auf dem Dünnschichtchromatogramm in WIV R_F-Werte bei o,54 und o,95. Die wäßrige Lösung wird mit Eis gekühlt, mit 5 ml n HCl versetzt und sofort mit 125 ml Ester extrahiert. Die Auswaage der eingeengten organischen Phase beträgt 2o mg. Danach zeigt SIII im DC R_F-Werte von((o,o)),o,16, (o,95). Der Hauptfleck des mit Chlorsulfonsäure eingesprühten Chromatogramms zeigt eine gelbe Farbe. Die Naphthoresorcinprobe verläuft negativ. Das Produkt ist in Wasser schlecht, in Alkali und Aceton gut löslich. Durch Zusatz von Äther und Cyclohexan kristallisiert es aus Aceton in feinen Nadeln vom Fp $1o3^{o}$-$11o^{o}$. Der Schmelzpunkt steigt auch nicht, wenn die Kristalle im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet werden. S III zeigt auf den Chromatogrammen einheitliche Flecke: PC R_F-Wert = o,49 (Z i m m e r m a n n - Reagens) und DC R_F-Wert =o,14 (Chlorsulfonsäure); ergibt eine schwache Anthronreaktion und einen positiven Nachweis mit Benzidin-Perjodat.

Fraktion B IV: Aus BIV gewinnt man durch Ansäuern mit HCl und Ausestern 22 mg Substanz mit den R_F-Werten: o,o, o,24,(o,8) und einen Glucuronsäuregehalt von 16%. Nachdem man das Produkt vom

Rückstand mit Essigester abgetrennt hat, wird es mit dem Filtrat der gesamten Ätherauszüge zusammengegeben (82 mg) und an einer kleinen Cellulosesäule chromatographiert (2 g Cellulose, Schleicher + Schüll, v_o = 4 ml). Man sammelt die anfallenden Fraktionen zu 4 Anteilen:

Fraktion Nr.	Größe ml	Auswaage mg	%	R_F-Werte auf dem DC Chlorsulfonsäure	Naphthoresorcin
a 1 - 6	1,5+v_o	17	21	o,82	-
b 7 -11	1,8	9	11	o,o+o,o5, o,12	o,o,o,o5
c 12-18	19,6	15	18	o,o+o,o5, o,12	o,o5
d ab 18	15o	28	34	o,o, o,o,o5 (o,12)	o,o-o,o5
	Zum Vergleich	S III:		o,12	

Fraktion b wird mit dem Filtrat von B II (Seite 52) zusammengegeben und noch einmal werden die Produkte chromatographiert. Man erhält ziemlich reine Androsteronglucuronsäure (7-1o mg) und reines Natriumsalz. Fraktion c gibt man über eine andere Säule und isoliert dabei neben 3 mg reiner Androsteronglucuronsäure 12 mg des Produktes S III.

Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure.

Fraktion S IV: Die IV. Hauptfraktion der Silicagelsäule (S.53) wird in 2n Natriumcarbonatlösung aufgenommen und mit Ester ausgeschüttelt (Ester R_F= o,77,DC). Durch Ansäuern und Ausestern gewinnt man 55 mg = 29% eines Produktes, das eine positive Z i m m e r m a n n - und Naphthoresorcin-Probe ergibt. Wird die eingeengte organische Phase mit Essigester aufgenommen und diese Operation mehrmals wiederholt, so erhält man einen Rückstand S IV R, der in den Chromatogrammen Flecke am Start (DC) und beim R_F = o,3 (PC) aufweist und nach F i s h - m a n 74% Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure enthält.

SIV R wird zusammen mit dem Natriumsalz aus den Fraktionen E und B V mehrfach aus Methanol-Äther umkristallisiert und mit Äther gewaschen. Das gereinigte Natriumsalz ergibt nach Trocknen im Hochvakuum nach F i s h m a n einen 96proz. Gehalt an freier Androsteronglucuronsäure, das entspricht einem 1oo,8proz. Natriumsalz der Androsteronglucuronsäure. Beim Behandeln mit Essigester bilden sich feine Nadeln (hexagonale Symmetrie), die bei 2o5° unter Zerkohlung schmelzen. Violursäure und Dinitrobenzol-KOH reagieren auf dem Papierchromatogramm bei dem R_F-Wert o,14 positiv. Auf der Dünnschichtplatte ist das Salz mit Naphthoresorcin und Chlorsulfonsäure am Start nachweisbar. Der bei der Verbrennung auf einem Spatel verbleibende Rückstand reagiert alkalisch. Der Drehwert des Natriumsalzes der Androsteronglucuronsäure beträgt $[\alpha]_D^{2o} = +38,5^o \pm 5^o$ (Methanol). Da das Salz noch vermutlich Wasser enthält, das mit den üblichen Methoden schwer zu entfernen ist, ist es nicht möglich, gut stimmende Analysenwerte zu erhalten.

Androsteron-glucuronsäure

Aus dem Filtrat der Fraktion S IV(SIV F) gewinnt man nach mehrfachem Umfällen aus Essigester-Cyclohexan und anschließender Behandlung mit Essigester-Cyclohexan-Äther Kristalle vom Schmelzpunkt 138 - 14o°. Sie zeigen im DC mit Naphthoresorcin einen R_F von o,o9.

Isolierung der Androsteronglucuronsäure aus einem 3. Oxydationsansatz: Werden 223,5 mg Oxydationsprodukt eines 3. Ansatzes an 12 g Cellulose chromatographiert, so erhält man 29 Fraktionen, deren R_F-Wert und Glucuronsäuregehalt aus der Tabelle hervorgeht (v_o= 26 ml):

Fraktion Nr.		R_F-Wert(DC,WIV)	Glucuronsäuregehalt
IIIA	3- 6	o,95	28% (Filtrat 38)
IIIB	7 -9	o,83	19
IIIC	8-12	o,75	96
IIID	13-17	o,44	
IIIE	18-29	o,29	14

In jeder Fraktion scheint etwas Androsteronglucuronsäure enthalten zu sein. Den besten Gehalt zeigt jedoch Fraktion IIIC, aus der man nach erneutem Chromatographieren 18 mg Substanz isoliert. Sie wird in der Kälte mit 1,2 ml n HCl angesäuert und mit 9o ml[+)] ausgeschüttelt. Der Rückstand der organischen Phase (12 mg) wird durch mehrmaliges Waschen mit Petroläther kristallin. Man nimmt das Produkt in 6 ml Essigester auf und setzt vorsichtig 5 ml CH zu. Es bilden sich erneut Kristalle vom Fp 146-148°, die einen Glucuronsäuregehalt von 96% aufweisen. Nach weiterem Umkristallisieren hat die Säure einen Fp von 168-17o°. Der R_F-Wert im PC(WIV) beträgt o,75, im DC o,o9 (Chlorsulfonsäure + Naphthoresorcin).

Weitere Salze der Androsteronglucuronsäure

Bariumsalz: Zur Fällung des Bariumsalzes der Androsteronglucuronsäure wird die Lösung des Natriumsalzes mit methanolischer Bariumhydroxydlösung versetzt, das ausgefallene Produkt abzentrifugiert und mehrmals umgefällt. Aus den Eluaten gewinnt man Kristalle, die im Dunkelfeld des Schmelzpunktapparates bei 23o° verschwinden. Zwar zeigt das Salz im Gemisch BIa auf dem Papierchromatogramm einen R_F-Wert von o,62, es enthält aber noch überschüssiges Barium.

Cinchoninsalz: Die wäßrige, alkalische Lösung des Natriumsalzes

+) Essigester

der Androsteronglucuronsäure wird mit o,1n HCl(1,5 ml) und o,o25n Cinchoninlösung (o,5 ml) bis zur alkalischen Reaktion zugegeben. Überschüssiges Cinchonin wird abfiltriert und das Filtrat eingeengt. Die papierchromatographische Analyse weist auf ein uneinheitliches Produkt hin. Das eingeengte Filtrat wird mehrmals aus Methanol-Wasser und darauf aus Aceton-Äther umkristallisiert, bis es chromatographisch einheitlich ist. Dadurch erhält man 14 mg Cinchoninsalz der Androsteronglucuronsäure mit einem R_F von o,86(PC,BIa). Der Fp beträgt nach Trocknen im Hochvakuum 15o-16o°. Die Proben nach Z i m m e r m a n n und D r a g e n d o r f reagieren positiv. Das Cinchoninsalz kristallisiert nach der Stickstoffanalyse wahrscheinlich mit 2 weiteren Molekülen Cinchonin aus. Vermutlich auf Grund schwer zu entfernenden Wassers in den Substanzproben ist es nicht möglich, gut stimmende Analysenwerte im Rahmen der sonst üblichen Forderungen zu erhalten.

Oxydation von Dehydro-epi-androsteron-ß-glucosid

5oo mg Glucosid werden in 15oo ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit 35 ml o,5 n $NaHCO_3$-Lösung versetzt. Es wird dann bei 7o° Sauerstoff durchgeleitet und im Verlauf der Reaktion, die 54 Std. dauert, 252 mg Platinkohle zugesetzt. Die kräftig gerührte Lösung wird auf einem pH von 8,8 gehalten. Das Dünnschichtchromatogramm einer angesäuerten Probe zeigt in Chloroform-Aceton nur einen Fleck bei o,o2 (Glucosid o,14). Darauf wird die Oxydation abgebrochen, die Lösung über ein Blaubandfilter gegeben und im Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Den Rückstand nimmt man in 35 ml Wasser auf und schüttelt die wäßrige Schicht 3x mit 1o ml Chloroform aus (Auswaage = 18 mg). Die eisgekühlte, wäßrige Lösung wird mit 18,5 ml 2n HCl angesäuert, das Oxydationsprodukt mit 4oo ml Essigester ausge-

schüttelt und die Esterphase eingeengt. Man erhält 252 mg = 49% rohes Material. Nimmt man das Produkt in Äthanol auf, dann bleibt ein anorganischer Rückstand mit einem Schmelzpunkt von über 360°. Um den anorganischen Bestandteil abzutrennen, wird das gesamte Produkt in 50 ml Äthanol aufgenommen und 1 Std. auf dem Wasserbad erhitzt. Das Filtrat zeigt danach im Papierchromatogramm im System Butanol-2n NH_3 Flecken bei den R_F-Werten o,95;o,77,(o,33),o,22($SbCl_3$,Dehydroepiandrosteronglucosid o,95). Beim Besprühen mit Naphtoresorcin zeigen die Hauptflecke o,77 und o,22 positive Farbreaktionen.

Der gesamte Oxydationsansatz (215 mg) wird darauf in 2 ml leichter Phase des BIa-Gemisches aufgenommen und auf eine Cellulose-Säule gegeben, die 11,5 g Whatman-Cellulose-powder enthält (v_o = 24 ml). Die Chromatographie mit der leichten Phase von Butanol-2n NH_3 liefert folgende Hauptfraktionen:

Fraktion	Nr.	Auswaage mg	%	R_F-Werte der Chromatogramme PC(BIa)	DC($CHCl_3$-Aceton)
E	1 - 3	51	34	o,95;o,77	o,1;o,16;o,22;o,28;o,8
A	4 -13	80	37	o,7;o,45	o,o,(10)
B	14-19	8	4	o,3	o,o;o,8;o,9
C	20-24	6	3	o,4;o,3	o,o;(o,1;o,8)
D	25-40	42	19	(o,4);o,2	o,o;o,18

Fraktion E wird mit 15 ml o,1n NaOH versetzt und mit 130 ml Ester ausgeschüttelt. Die Auswaage der eingeengten organischen Phase beträgt 12,5 mg, das DC zeigt folgende R_F-Werte: o,19;o,86;o,93. Die alkalische Lösung von E wird mit 5 ml HCl angesäuert und mit 300 ml Essigester ausgeschüttelt. Der eingeengte Rückstand liefert34,5 mg, das DC die R_F-Werte o,o,(o,19).

Fraktionen A-D werden zusammen mit 20 ml o,1n NaOH auf-

genommen und mit viel Ester ausgeschüttelt. Die Esterphase(16 mg) hat folgendes Chromatogramm: o,19;o,79;o,86;o,93. Die alkalische Phase wird mit Eis versetzt, darauf mit 5 ml n HCl angesäuert und mit 3oo ml Ester ausgeschüttelt. Die Auswaage beträgt 53,5 mg, das DC zeigt die R_F-Werte: o,o und (o,19). Aus der wäßrigen Lösung gewinnt man 8 mg Produkt der Zusammensetzung: o,o;o,14;o,23 und o,39.

Dehydro-epi-androsteron-glucuronsäure

Das isolierte Produkt wird mit 3 x 5 ml Äther behandelt. Der Rückstand von 18 mg wird in 4 ml Aceton aufgenommen und dann mit 15 ml Äther und 5 ml Cyclohexan versetzt. Die quantitative Bestimmung nach F i s h m a n ergibt einen 7oproz. Gehalt an Steroidglucuronsäure. Die R_F-Werte im Dünnschichtchromatogramm(WIV) betragen:o,o-o,o7,(o,24) und auf dem Papierchromatogramm (BIa):o,21;o,41;(o,8). Nach erneutem Umfällen aus Aceton-Methanol erhält man 17 mg, die man in 5 ml o,1n NaOH auflöst und mit 3 x 1o ml Äther ausschüttelt. Die alkalische Lösung gibt man vorsichtig über Ionenaustauscher, Amberlite IRC 5o, und spült mit 5o ml bidestilliertem Wasser nach. Die Auswaage des eingeengten Eluats beträgt 12 mg. Beim Verbrennen auf einem Spatel findet man kaum einen Rückstand. Das Papierchromatogramm zeigt einen einheitlichen R_F-Wert bei o,4(Zimmermann-Reagens) bzw. o,39(Naphthoresorcinprobe). Im DC findet man folgende Werte: o,o, o,o5,(o,86). Die Säure wird vom Natriumsalz dadurch getrennt, daß man zunächst den Rückstand ausfällt, das Filtrat einengt und mit 2 ml Essigester aufnimmt. Durch Zusatz von 5 ml Cyclohexan wird die Säure auskristallisiert. Dieser Arbeitsgang wird 3 x wiederholt. Das Dünnschichtchromatogramm des so isolierten Produktes zeigt folgende R_F-Werte: o,o4,(o,93).

Die Säure wird nochmals aus Ester-Äther-Cyclohexan umkristallisiert, der Glucuronsäuregehalt beträgt danach 1oo% und der Fp ist von ursprünglich 135-39° auf 186-189° angestiegen.

Natriumsalz der Dehydro-epi-androsteron-glucuronsäure

Der Ätherextrakt der Fraktionen A-D(Auswaage = 35 mg) zeigt im Dünnschichtchromatogramm die R_F-Werte o,o-o,o5 (Naphthoresorcin) bzw. o,o;o,1;(o,3;o,9).+) Der Glucuronsäuregehalt beträgt 38%. Nimmt man den eingeengten Extrakt mit 2 ml Aceton auf, setzt 1o ml Äther und 1o ml Cyclohexan zu, so erhält man 21 mg eines Produktes, das einen Fp von 11o-115° aufweist und im DC folgende R_F-Werte:o,o-o,o7;(o,24;o,29), im Papierchromatogramm die Werte von o,21,o,41,(o,8)zeigt. Das Filtrat dieser Ausfällung enthält folgende Produkte:(o,24; o,29) und o,9. Der Rückstand wird mit Ester und Äther versetzt und wird dabei kristallin. Die Auswaage beträgt 1o mg, der R_F Fleck liegt im Dünnschichtchromatogramm am Start, das Filtrat zeigt dagegen R_F-Werte bei:o,o,o,o4,(o,17). Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol-Äther ergibt die quantitative Analyse einen 1ooproz. Gehalt an Natriumsalz der Steroidglucuronsäure. Auf dem Papierchromatogramm reagiert das Produkt positiv mit Violursäure bei einem R_F von o,23 und mit Dinitrobenzol-KOH bei den Werten o,23,(o,36). Auf der Dünnschichtplatte ergibt das Salz nach Chromatographieren mit WIV mit Naphthoresorcin einen blauen Fleck am Start. Bei 2oo° tritt Verkohlung ein. Der Drehwert des Natriumsalzes der Dehydro-epi-androsteron-glucuronsäure wird in Methanol aufgenommen: $[\alpha]_D^{12,8} = -9,8° \pm 2°$. Aus äußeren Gründen war es nicht möglich, einwandfreie Analysenwerte zu erhalten.

+) (Chlorsulfonsäure)

Zusammenfassung

Die physikalischen Eigenschaften und das chromatographische Verhalten der behandelten Verbindungen sind in der folgenden Tabelle noch einmal kurz zusammengefaßt:

Verbindung	Fp	$[\alpha]_D$	R_F-DC		R_F-PC	
			WI	WII	$CHCl_3$-Aceton	WIV
Cholesteringlucosid	275-285	- 48,8	o,25			
Cholesteringlucuronsäure	272-274		o,1			
Cinchoninsalz der Säure	237-242		o,42			
Ergosteringlucosid	293-297	-1o1,5	o,57	o,12		
			WIII	BIa		
Androsteronglucosid	124 217-225	+ 35,4	o,9	o,96	o,36	o,54
Androsteronglucuronsäure	168-17o		o,5 o,7		o,o	o,o9
Natriumsalz der Säure	(2o5)	+ 38,5	o,2		o,o	o,o
Cinchoninsalz der Säure	15o-16o			o,86		
Produkt S III	1o3-11o		o,4		o,o	o,15
Dehydroepiandrosteron-glucosid	225-226,5	-6,o		o,9	o,27	o,3
-glucuronsäure	186-189			o,4	o,o o,o2	o,o5
Natriumsalz der Säure	(2oo)	-9,8		o,2	o,o	o,o

VII. Literaturverzeichnis

1.)	E. Fischer u. O. Piloty	Ber.dtsch.chem.Ges.24,521(1891)
2.)	O. Schmiedeberg u. H. Meyer	Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 3, 422(1879)
3.)	Mering	Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 6, 489(1882)
4.)	S.L.Cohen u. F. Marian	Biochem.J. 3o,57 (1936)
5.)	S.L. Cohen u. F. Marian u. A. D. Odell	Biochem.J. 3o, 225o(1936)
6.)	H. H. Wotiz u. Mitarb.	J.Clin.Endrocinol.and Metabolism 17,534(1957)
7.)	H.H. Wotiz, H.G.Sieh u. W. F. Fishman	J.biol.Chemistry 232, 723(1958)
8.)	K. Schubert	Acta Endrocrinologica 27, 36 (1958)
9.)	K.D. Voigt u. Mitarb.	Biochem. Z. 331, 356 (1959)
1o.)	E. Shapiro	Biochem. J. 33, 385 (1939)
11.)	W. Königs u. E. Knorr	Ber.dtsch. chem. Ges.34,957 (19o1)
12.)	W. Zorbach	J.org.Chem. 23,1797 (1958)
13.)	H.H.Wotiz, E.Smakula, N.Lichtin u.H. Leftin	J.Amer.chem.Soc. 81, 17o4(1959)
14.)	H. Hadd	Am.chem.Soc.Div.of biol.chem. Soc. 54C, Sept. 1958
15.)	K. Maurer u. G.Drefahl	Ber.dtsch.chem.Ges.75,1489(1942)
16.)	Smolenski	Roczniki Chem.[Ann.Soc.chim. Polonorum] 3,153 (1924)
17.)	C. Niemann u. P. Link	J.biol.Chemistry 1o4, 195(1934)
18.)	K.Heyns u. H. Paulsen	Angew.Chem. 69, 6oo (1957)

19.) C. L. Mehltretter u. Mitarb. — J.Amer.chem.Soc. 73,2424(1951)

2o.) C. A. Marsh — J.chem.Soc.[London] 1952, 1578

21.) Kwan-Chung Tsou u. A. Seligman — J.Amer.chem.Soc. 75, 1o42(1953)

22.) Ch. Meystre u. K.Miescher — Helv.chim.Acta 27,231(1944)

23.) H.G. Fletscher u. C.S. Hudson — J.Amer.chem.Soc.72,4173(195o)

24.) L. F. Fieser — J.Amer.chem.Soc.75,5421(1953)

25.) J.W. Mac Corquodale, H.Steenbock u. H.Adkins — J.Amer.chem.Soc.52,2512(193o)

26.) I. E. Bush — Biochem. 67, 23P (1957)

27.) E. Stahl — Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958)

28.) K. Miescher u. W. H. Fischer — Helv.chim.Acta 21,336(1938)

29.) Liebermann — Ber.dtsch.chem.Ges.18,18o4 (1885)

3o.) J.L.Bryson u. T. Mitchell — Nature[London] 167, 864(1951)

31.) W. Fishman u.S. Green — J.biol.Chemistry 215,527(1955)

32.) W. E. Trevelyan, D.P. Procter u. J.S.Harrison — Nature[London] 166,444(195o)

33.) W. Zimmermann — Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 233, 257(1935)

34.) H. Erlenmeyer,H. v.Hahn u. E. Sorkin — Helv.chim.Acta 34,1419(1951)

35.) E.Smakula, J.H. Leftin u. H. H. Wotiz — J.Amer.chem.Soc. 81, 17o8(1959)

36.) W. Brügel — Einführung in die Ultrarotspektroskopie 277 (D.Steinkopff, Darmstadt 1954)

37.) L. Larsson — Acta chem. Scand. 4, 27 (195o)

38.) J. A. Labarrere, J.R. Chipault u.W.O.Lundberg	Analytic.Chem.30,1466(1958)
39.) H. Pelzer	Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 314, 234(1959)
4o.) W. Staib u. K. Dönges	Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 319, 233(196o)
41.) Gattermann-Wieland	Praxis des organischen Chemikers, 34o (1954) (de Gruyter,36. Aufl. Berlin)
42.) C. E. Redemann u. C. Niemann	Org.Synth.Coll.Vol. III, 11
43.) Houben-Weyl	Methoden der organischen Chemie 3, 1157(G.Thieme,Stuttgart 1925 3. Aufl.)
44.) W. Klyne	Proc.Biochem.Soc.,Biochem.J. 47, xli (195o)
45.) B. Görlich	DBP 935968(1955) u. priv.Mitt.
46.) H. Reich u. T.Reichstein	Helv.chim.Acta 26, 562, 583(1943)
47.) F. Kaiser	Chem.Ber. 88, 556(1955)

Lebenslauf

Am 28. Januar 1931 wurde ich, Klaus Edgar Paul Winguth, in Bütow in Pommern als Sohn des Studienrates Erich Winguth und seiner Ehefrau Margarete geb. Anthes geboren. Im April 1937 wurde ich in die Moritz-Grundschule in Köslin eingeschult. 1941 kam ich zur Oberschule für Jungen in Labes/Pommern und wechselte 1943 zur Bugenhagenschule in Stettin-Pölitz über. Die letzten Kriegsjahre verbrachte ich in der Kinderlandverschickung. 1945 arbeitete ich zunächst bei den Russen, später in der Landwirtschaft und konnte im November 1946 meine Schulausbildung in Bergen auf Rügen fortsetzen. Im Juni 1950 machte ich dort an der Ernst-Moritz-Arndt-Oberschule mein Abitur. In Hamburg arbeitete ich anschließend in einer chemischen Fabrik und konnte im Mai 1951 an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel mit dem Studium der Chemie beginnen. Im Juli 1954 legte ich das Vordiplom ab. Nach einer Arbeit bei Herrn Professor Grewe über die Oxydation von Methoxybutenon mit Benzopersäure bestand ich im Jahre 1957 das Diplom. Ich kam im Anschluß daran nach Hamburg an die biochemische Abteilung des Chemischen Staatsinstitutes der Universität, deren Leiter Herr Professor Tschesche war, um zu promovieren.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

Grewe, Hahn, Hertel, Heyns, Juza, Kleinfeller, Kröbel, Leonhardt, Lochte-Holtgreven, Martin, Mondon, Netter, Otremba, Thiele, Tschesche und Zerbe.